



Nº 418.743

Int. C. C I Z D

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un^a

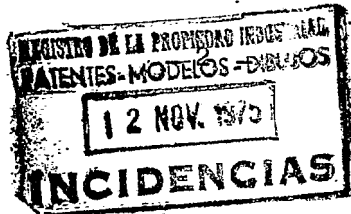
PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: BRISTOL-MYERS COMPANY.

RESIDENCIA: 345 Park Avenue, NEW YORK, N.Y. 10022, U.S.A.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL
COMPLEJO ANTIBIOTICO DE LA BUTIROSINA.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 288.623 del 13.9.72



1

Esta invención proporciona el complejo antibiótico Bu 1975 y los componentes C₁ y C₂ aislados del mismo. El complejo antibiótico Bu 1975 y especialmente los componentes C₁ y C₂ purificados son útiles como agentes antibacterianos, como suplementos nutritivos en piensos para animales, como agentes terapéuticos en el ganado aviar y en los animales, incluido el hombre y son especialmente valiosos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Cuando se administran por vía oral, los componentes C₁ y C₂ son útiles como tratamiento auxiliar para la esterilización pre-operatoria del intestino.

5

10

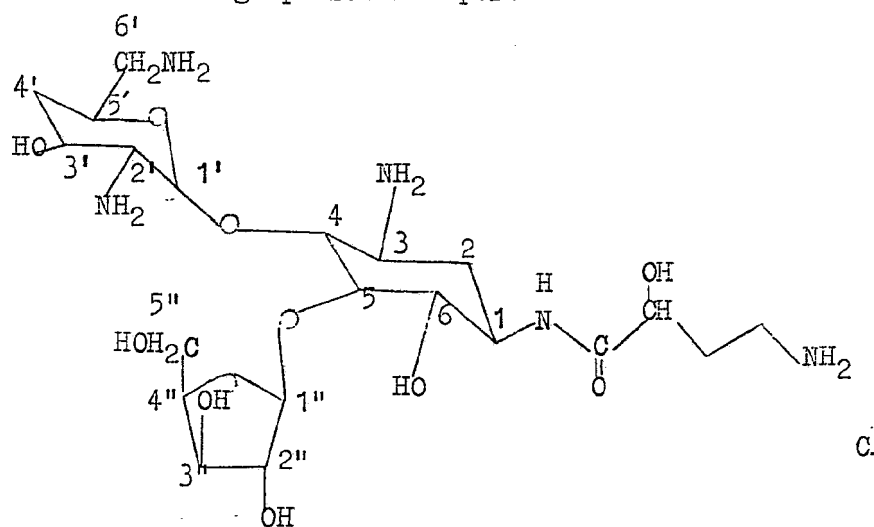
15

Esta invención proporciona el complejo antibiótico Bu 1975 aislado del caldo de fermentación de Bacillus circulans subsp. n. croceus, Bacillus circulans subsp. n. proteophilus, o Bacillus circulans subsp. n. biotinicus, que contiene como componentes bioactivos 4'-desoxiambutirosina A (C₁) y 4'-desoxiambutirosina B (C₂).

20

Esta invención también proporciona un compuesto seleccionado entre el grupo formado por:

25



30



1

5

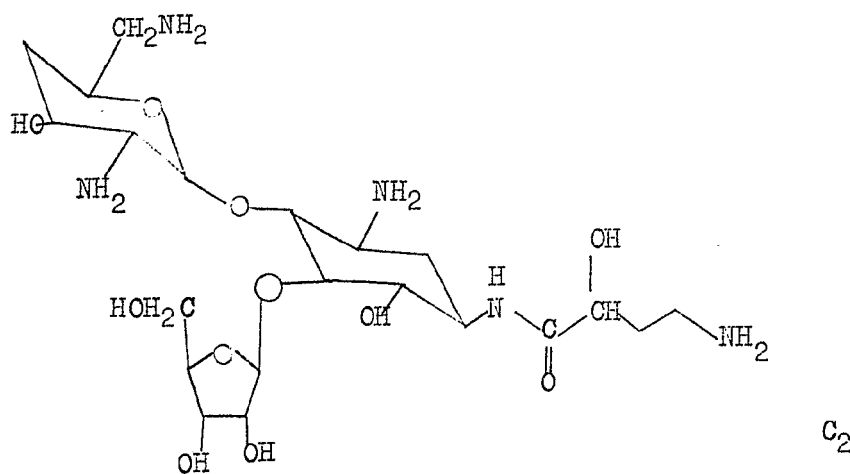
10

15

20

25

30



y las sales de adición de ácido del mismo farmacéuticamente aceptables.

Esta invención proporciona además un procedimiento para la preparación del complejo antibiótico Bu 1975 y sus componentes C₁ y C₂, caracterizado porque el compuesto antibiótico Bu 1975 se produce por fermentación aerobia utilizando el cultivo denominado Bacillus circulans subsp. n. croceus (A.T.C.C. 21820), Bacillus circulans subsp. n. proteophilus (A.T.C.C. 21821) o Bacillus circulans subsp. n. biotinicus (A.T.C.C. 21822), aislando después el complejo antibiótico Bu 1975 del caldo de fermentación y cuando se desean los componentes C₁ o C₂, aislando estos últimos de dicho complejo antibiótico Bu 1975.

El complejo antibiótico Bu 1975 se aísla del caldo de fermentación de Bacillus circulans subsp. n. croceus, Bacillus circulans subsp. n. proteophilus o Bacillus circulans subsp. n. biotinicus. Estas tres variedades de Bacillus circulans son denominadas respectivamente variedades números C308-B4, C436-B1 y C532-B2 en la colección de cultivos Bristol-Banyu.



1 Un cultivo de cada uno de los organismos vivos se ha depositado en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 y los cultivos han recibido los siguientes nombres y números de catálogo:

5 Bacillus circulans subsp. n. croceus (variedad número C308-B4), A.T.C.C. 21820.

Bacillus circulans subsp. n. proteophilus (variedad nº C436-B1), A.T.C.C. 21821.

10 Bacillus circulans subsp. n. biotinicus (variedad nº C532-B2), A.T.C.C. 21822.

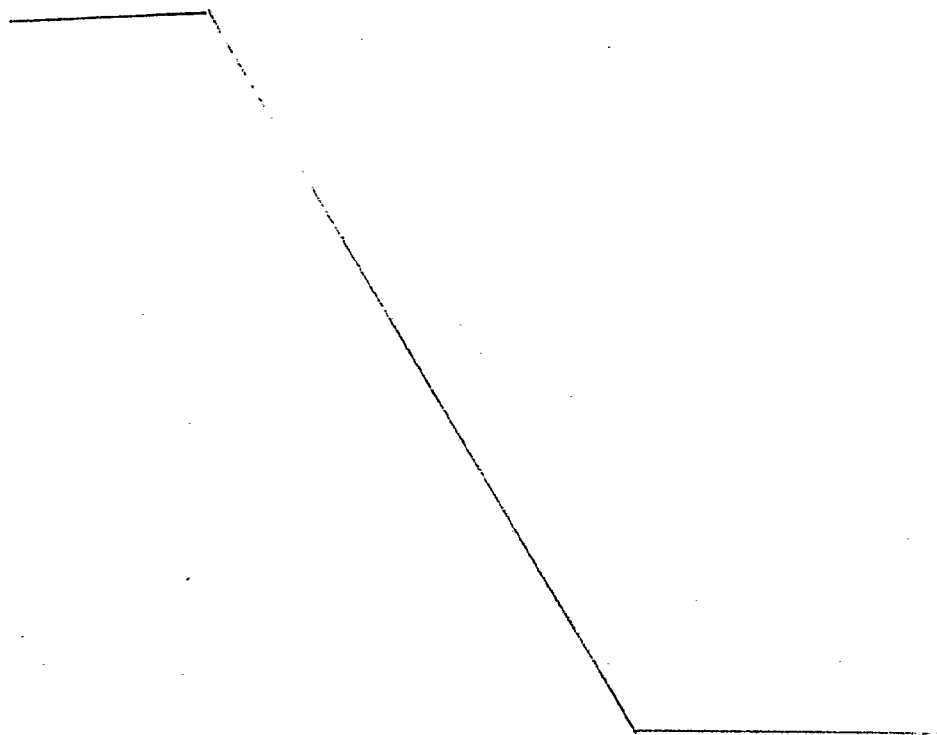
Las características morfológicas y de cultivo de estas variedades se encuentran en la Tabla I. La reacción fisiológica y la utilización de las fuentes de carbono de las variedades se encuentran en las Tablas II y III, respectivamente.

15

20

25

30





1

TABLA I

Características morfológicas y de cultivo de los organismos productores de Bu-1975

Variedad número	C308-B4	CA36-B1	C532-B2
Células vegetativas:	Varillas, 0,4 a 0,6 por 1,5 a 4,0 micras, con extremos redondeados, sin formar cadenas. Cierta disposición de empalizada. Gram-variable, en su mayoría negativas.	Varillas, 0,6 a 0,8 por 2,0 a 6,0 micras, con extremos redondeados, sin formar cadenas. Gram-variable, en su mayoría negativas.	Varillas, 0,4 a 0,6 por 1,0 a 5,0 micras, con extremos redondeados, sin formar cadenas. Gram-variable, en su mayoría negativas.
Esporas:	Ovales a elipsoidales, 0,9 a 1,4 por 1,4 a 2,2 micras; terminales a subterminales, paredes de las esporas gruesas y fácilmente manchadas.	Ovales a elipsoidales, 0,9 a 1,2 por 1,3 a 2,2 micras; paracentrales a terminales, paredes de las esporas gruesas y fácilmente manchadas.	Ovales a elipsoidales, 1,0 a 1,4 por 1,5 a 2,4 micras; terminales, paredes de las esporas gruesas y fácilmente manchadas.
Esporangios:	Definidamente hinchados y en forma de raqueta.	Definidamente hinchados y en forma de huso a raqueta.	Definidamente hinchados y en forma de raqueta.
Motilidad:	No se encuentran células móviles.	Móviles	Móviles
Tubo inclinado de agar nutritivo:	Crecimiento abundante, espeso, opaco, liso, viscoso y cremoso que se vuelve naranja pálido con el tiempo.	Crecimiento tardío, moderado, delgado, opaco, liso viscoso y cremoso.	Crecimiento abundante, espeso, opaco, liso, ligeramente viscoso y blanquecino.
Tubo inclinado de agar glucosa-espina ragina	Crecimiento moderado. Levantado, semitranslucido, liso, resplandeciente, arrugado, pegajoso y amarillo pálido.	Crecimiento escaso, delgado, translucido, liso, pegajoso e incoloro.	Crecimiento nulo o escaso.
Caldo de glucosa:	pH 5,3-5,0 (37°C). Película ligeramente viscosa o crecimiento en anillo. Produce turbidez y sedimento.	pH 7,5-8,0 (28°C). Película viscosa. Ligera turbidez y sedimento.	pH 6,8-5,8 (37°C). Ninguna película. Ligera turbidez y denso sedimento. Caldo de glucosa más biotina: pH 8,0-9,0. Película completa. Turbidez y ligero sedimento.
Colonias sobre agar nutritivo:	Circular, en forma levantada o en forma de cúpula con margen completo. Opaco con superficie lisa y resplandeciente. Tamaño: 1,0-3,5 mm (de diámetro). Viscoso y naranja pálido. Ninguna colonia satélite.	Circular o ligeramente irregular, levantado con margen opaco con superficie lisa. Tamaño: 1,0-4,0 mm (de diámetro). Viscoso y cremoso. Ninguna colonia satélite.	Entre plano y ligeramente levantado con un margen ligeramente irregular. Opaco con superficie lisa. Tamaño: 0,8-4,0 mm (de diámetro). Ligeramente viscoso y blanco cremoso. Sin colonias satélites.

5

10

15

20

25

30

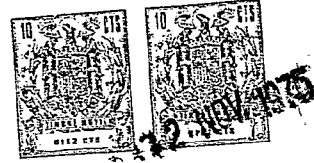


TABLA I

morfológicas y de cultivo de los organismos productores de Bu-1975

	<u>C436-B1</u>	<u>C532-B2</u>
<u>,6 por 1,5</u> <u>extremos</u> <u>formar ca-</u> <u>posición</u> <u>am-varia-</u> <u>a negati-</u>	Varillas, 0,6 a 0,8 por 2,0 a 6,0 micras, con extremos redondeados, sin formar cadenas. Gram-variable, en su mayoría negativas.	Varillas, 0,4 a 0,6 por 1,0 a 5,0 micras, con extremos redondeados, sin formar cadenas. Gram-variable, en su mayoría negativas.
<u>ales, 0,9</u> <u>,2 micras;</u> <u>erminales,</u> <u>poras grue-</u> <u>manchadas.</u>	Ovales a elipsoidales, 0,9 a 1,2 por 1,3 a 2,2 micras; paracentrales a terminales, paredes de las esporas gruesas y fácilmente manchadas.	Ovales a elipsoidales, 1,0 a 1,4 por 1,5 a 2,4 micras; terminales, paredes de las esporas gruesas y fácilmente manchadas.
<u>chados y</u> <u>ta.</u>	Definidamente hinchados y en forma de huso a raqueta.	Definidamente hinchados y en forma de raqueta.
<u>células mō</u>	Mōviles	Mōviles
<u>ante, espe</u> <u>viscoso y</u> <u>elvel naran-</u> <u>tiempo.</u>	Crecimiento tardīo, moderado, delgado, opaco, liso viscoso y cremoso.	Crecimiento abundante, espeso, opaco, liso, ligeramente viscoso y blanquecino.
<u>rado. Levan</u> <u>fcido, liso,</u> <u>arrugado,</u> <u>lo pālido.</u>	Crecimiento escaso, delgado, translūcido, liso, pegajoso e incoloro.	Crecimiento nulo o escaso.
<u>). Película</u> <u>osa o creci-</u> <u>. Produce</u> <u>ento.</u>	pH 7,5-8,0 (28°C). Película viscosa. Ligera turbidez y sedimento.	pH 6,8-5,8 (37°C). Ninguna película. Ligera turbidez y denso sedimento. Caldo de glucosa más biotina: pH 8,0-9,0. Película completa. Turbidez y ligero sedimento.
<u>na levanta-</u> <u>cúpula con</u> <u>Opaco con</u> <u>y resplande</u> <u>1,0-3,5 mm</u> <u>iscoso y na</u> <u>nguna colo-</u>	Circular o ligeramente irregular, levantado con margen irregular. Opaco con superficie lisa. Tamaño: 1,0-4,0 mm (de diámetro). Viscoso y cremoso. Ninguna colonia satélite.	Entre plano y ligeramente levantado con un margen ligeramente irregular. Opaco con superficie lisa. Tamaño: 0,8-4,0 mm (de diámetro). Ligeramente viscoso y blanco cremoso. Sin colonias satélites.

TABLA I (continuación)

Variedad número	C308-B4	G436-B1	G532-B2
1			
	Temperatura de crecimiento		
5	37°C	30°C	45°C
	Crecimiento moderado:		
	28-45°C	22-37°C	28-50°C
	Crecimiento restringido:		
	20°C, 48°C	20°C, 40°C	25°C, 53°C
	18°C, 50°C	18°C, 42°C	20°C, 55°C
10	15°C, 53°C	12°C, 45°C	15°C, 58°C
	Demanda de oxígeno: Aerobio		
	Caldo de NaCl		
	0-1 % NaCl	0-3 % NaCl	0-2 % NaCl
	Crecimiento: Crecimiento nulo:		
	2 % NaCl	4 % NaCl	3 % NaCl
15	Película viscosa y gruesa, naranja pálido, con sedimento viscoso. Ningún otro cambio.	Película viscosa y gruesa con sedimento viscoso. Ningún otro cambio.	Película viscosa, gruesa y de color naranja pálido con sedimento escaso. Coagulada sin peptonización. pH ligeramente alcalino.
20	Película pegajosa de color naranja pálido. Gelatina licuada completamente al cabo de una semana.	Película pegajosa y cremosa. Gelatina licuada completamente al cabo de una semana.	Película pegajosa blanquecina. Gelatina licuada completamente al cabo de una semana.
25	Factor de crecimiento: El ácido nicotínico, la biotina y un complejo de aminoácidos aceleran el crecimiento.	El ácido nicotínico, la biotina y un complejo de aminoácidos aceleran el crecimiento.	La biotina es esencial para el crecimiento.
30			

TABLA I (continua)

	<u>Variedad número</u>	<u>C308-B4</u>	<u>C43</u>
	Temperatura de crecimiento		
5	Optima:	37°C	30°C
	Crecimiento moderado:	28-45°C	22-37°C
	Crecimiento restringido:	20°C, 48°C	20°C, 40°C
	Crecimiento escaso:	18°C, 50°C	18°C, 42°C
10	Crecimiento nulo:	15°C, 53°C	12°C, 45°C
	Demanda de oxígeno:	Aerobio	Aerobio
	Caldo de NaCl		
	Crecimiento:	0-1 % NaCl	0-3 % NaCl
	Crecimiento nulo:	2 % NaCl	4 % NaCl
15	Leche:	Película viscosa y gruesa, naranja pálido, con sedimento viscoso. Ningún otro cambio.	Película viscosa con sedimento. Ningún otro cambio.
	Plancha de gelatina:	Película pegajosa de color naranja pálido. Gelatina licuada completamente al cabo de una semana.	Película pegajosa. Gelatina licuada completamente al cabo de una semana.
20	Factor de crecimiento:	El ácido nicotínico, la biotina y un complejo de aminoácidos aceleran el crecimiento.	El ácido nicotínico, la biotina y un complejo de aminoácidos aceleran el crecimiento.

25

30



TABLA I (continuación)

-B4	G436-B1	G532-B2
	30°C	45°C
	22-37°C	28-50°C
	20°C, 40°C	25°C, 53°C
	18°C, 42°C	20°C, 55°C
	12°C, 45°C	15°C, 58°C
	Aerobio	Aerobio
	0-3 % NaCl	0-2 % NaCl
	4 % NaCl	3 % NaCl
cosa y gruesa, do, con sedi- o. Ningún otro	Película viscosa y gruesa con sedimento viscoso. Nin ^g ún otro cambio.	Película viscosa, gruesa y de color naranja pálido con sedimento escaso. Coagulada sin peptonización. pH lige- ramente alcalino.
ajosa de color do. Gelatina li- tamente al cabo a.	Película pegajosa y cremo- sa. Gelatina licuada com- pletamente al cabo de una semana	Película pegajosa blanqueci- na. Gelatina licuada comple- tamente al cabo de una sema- na.
otínico, la bio mplejo de aceleran el cre	El ácido nicotínico, la biotina y un complejo de aminoácidos aceleran el crecimiento.	La biotina es esencial para el crecimiento.

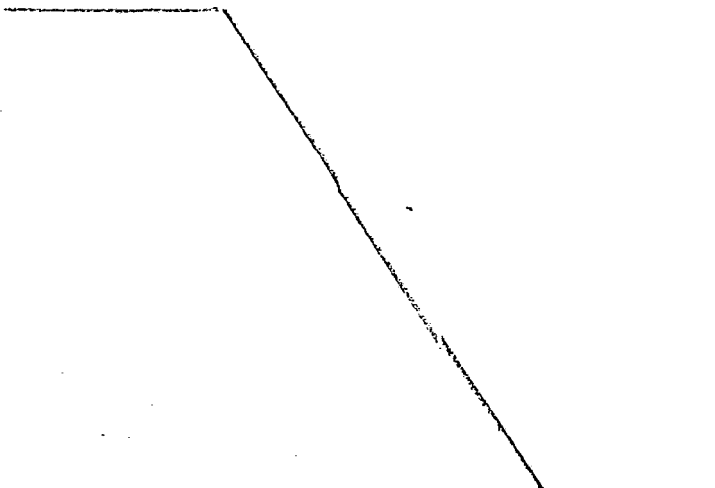




TABLA II

Reacciones fisiológicas

<u>Ensayo</u>	<u>Variedad nº:</u>	<u>C308-B4</u>	<u>C436-B1</u>	<u>C532-B2</u>
Gas de los hidratos de carbono		negativa	negativa	negativa
Licuefacción de gelatina		positiva (intensa)	positiva (intensa)	positiva (intensa)
Producción de indol		negativa	negativa	negativa
Hidrólisis del almidón (color de la reacción con yodo)		positiva (amarillo anaranjado)	positiva (amarillo anaranjado)	positiva (amarillo anaranjado)
Utilización de citrato		negativa	negativa	negativa
Nitrito a partir de nitrato		positiva	positiva	positiva
Reacción de ureasa		negativa	negativa	negativa
Reacción de catalasa		positiva	positiva	positiva
Reacción de oxidasa		negativa	negativa	negativa

TABLA III

Producción de ácido a partir de hidratos de carbono

<u>Variedad nº</u>	<u>C308-B4</u>			<u>C-436-B1</u>			<u>C532-B2</u>		
	<u>I*</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>
Glicerol	+	+	++	+	+	+	+	+	++
L-Arabinosa	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-Xilosa	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-Ramposa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fructosa	+	+	-	-	-	-	+	-	-
D-Galactosa	+	+	++	+	+	+	+	+	-
D-Glucosa	+	+	++	+	+	++	+	+	++
D-Manosa	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	++	+	+	+
Lactosa	+	+	+	-	-	-	+	+	-



TABLA III (continuación)

Variedad nº	C308-B4			C436-B1			C532-B2		
	<u>I*</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>
Maltosa	+	+	++	+	+	++	+	+	++
D-Rafinosa	<u>+</u>	-	-	-	-	-	<u>+</u>	-	-
Inositol	+	+	+	<u>+</u>	-	-	+	+	<u>+</u>
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	+	+	++	+	+	+	+	+	++
Celulosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicilina	+	+	+	+	+	-	+	+	<u>+</u>

* Medio basal I: 0,1 % NH_4NO_3 , 0,1 % K_2HPO_4 , 0,03 % KH_2PO_4 , 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05 % NaCl con 10 mcg/ml de aspartato, glutamato y de triptófano, 1 mcg/ml de ácido nicotínico y 0,05 mcg/ml de biotina.

Medio basal II: 0,1 % NH_4Cl , 0,1 % K_2HPO_4 , 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 % NaCl, 0,1 % CaCO_3 , 0,01 % de extracto de levadura, 1,5 % de Bactoagar con 1 mcg/ml de ácido nicotínico y 0,05 mcg/ml de biotina.

Medio basal III: Caldo de peptona.

A la vista de las características morfológicas, fisiológicas y de cultivo descritas en estas tablas, se llegó a la conclusión de que las tres variedades pertenecían a la especie de Bacillus circulans. Las diferencias significativas entre cada una de estas tres variedades y el B. circulans típico están resumidas a continuación:



1 Variedad C308-B4:

Color de la colonia : naranja pálido.

Factor de crecimiento : el ácido nicotínico, la biotina
5 y los complejos de aminoácido
aceleran el crecimiento.

Utilización de azúcar : la L-arabinosa y D-xilosa no son
utilizadas.

Variedad C436-B1:

10 Caldo de glucosa : reacción débilmente alcalina
(pH 7,5-8,0) al cabo de 3-5 días.

Temperatura de creci- : temperatura óptima inferior
miento (30°C) y crecimiento nulo a
45°C.

15 Factor de crecimiento : el ácido nicotínico, la biotina
y los complejos de aminoácidos
aceleran el crecimiento.

Variedad C532-B2:

20 Factor de crecimiento : la biotina es esencial para el
crecimiento.

Utilización de azúcar : la L-arabinosa y la D-xilosa no
son utilizadas.

25 A la vista de las diferencias anteriores, las tres va-
riedades del organismo productor de Bu 1975 recibieron los si-
guientes nombres de subespecies:

Bacillus circulans subsp. n. croceus (variedad C308-B4)

Bacillus circulans subsp. n. proteophilus (variedad C436-B1)

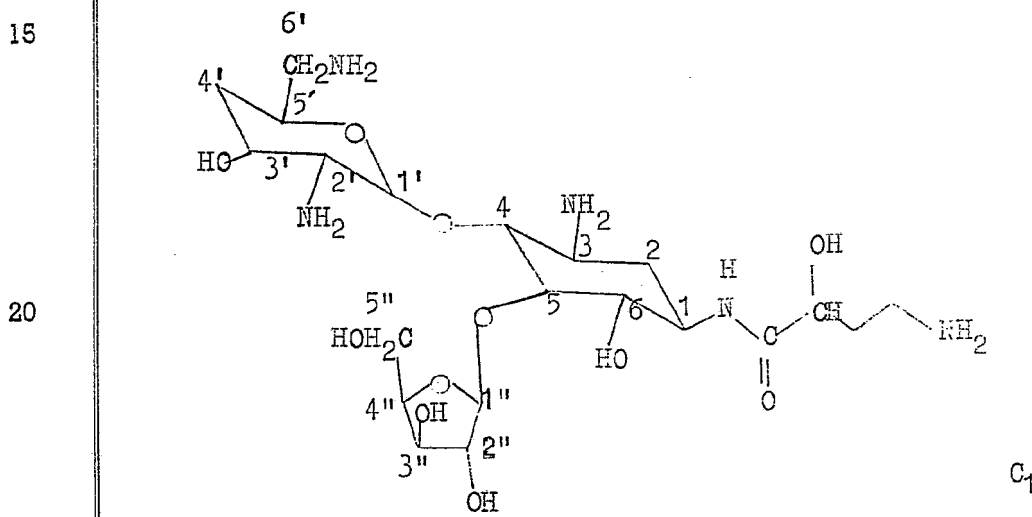
Bacillus circulans subsp. n. biotinicus (variedad C532-B2).

30 Esta invención proporciona el antibiótico Bu 1975. Es-
te es un complejo de por lo menos cinco componentes bioacti-



1 vos, A₁, A₂, B, C₁ y C₂. Los componentes A₁ y A₂ se han iden-
tificado respectivamente con lasambutirosinas A y B [véase
la patente estadounidense nº 3.541.078 y Tetrahedron Letters,
28, págs. 2625-2628 (1971)]. El componente B es un antibióti-
co extraíble por disolvente con propiedades similares a los
5 péptidos.

Los componentes C₁ y C₂ que también son proporcionados
mediante esta invención, son nuevos antibióticos aminoglicosi-
sidos. Se ha encontrado que el C₁ está constituido por D-xi-
10 losa, 2-desoxistreptamina, ácido L(-)-γ-amino-α-hidroxi-butí-
rico y 2,6-diamino-2,4,6-tridesoxi-D-glucosa, un nuevo deso-
xiaminoazúcar. Se ha determinado que el componente C₁ es
4'-desoxiambutirosina A con la siguiente estructura:



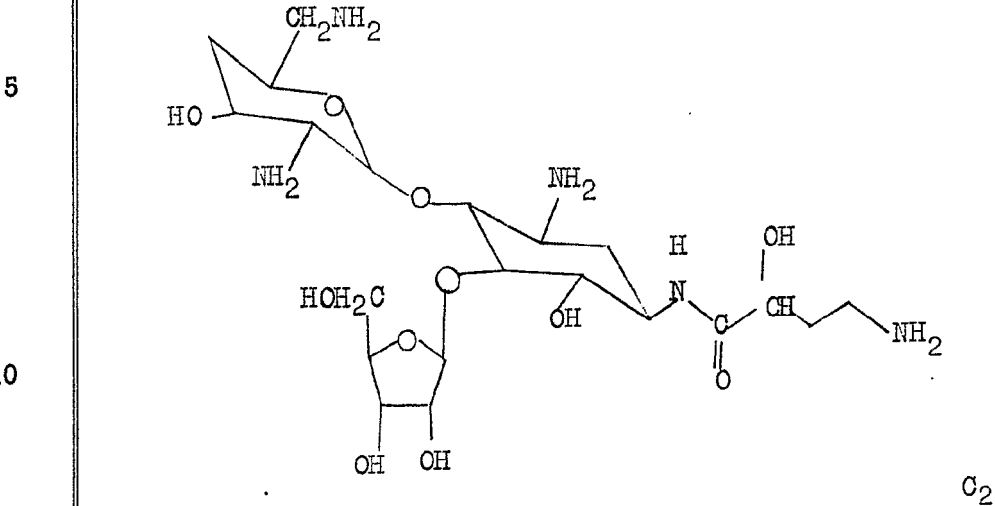
25 El componente C₁ es conocido químicamente por N¹-(4-
amino-2-hidroxi-butiril)-4-O-(2,6-diamino-2,4,6-tridesoxi-D-
glucopiranosil)-5-O-D-xilofuranosil-2-desoxistreptamina.

30 Se ha encontrado que el componente C₂ está constitui-
do por D-ribosa, 2-desoxistreptamina, ácido L(-)-γ-amino-α-
hidroxibutírico y 2,6-diamino-2,4,6-tridesoxi-D-glucosa. El

12 NOV



1 C₂ es 4'-desoxiambutirosina B y presenta la siguiente estructura:



15 El componente C₂ es conocido químicamente por N¹-(4-amino-2-hidroxi-butiril)-4-O-(2,6-diamino-2,4,6-trideoxi-D-glucopiranosil)-5-O-D-ribofuranosil-2-desoxistreptamina.

Los antibióticos de esta invención se producen de la manera siguiente:

20 Un tubo inclinado de agar bien crecido del organismo productor de Bu 1975 se utiliza para inocular un medio de siembra que contiene 1,5 % de glucosa, 0,5 % de polipeptona, 0,2 % de extracto de levadura, 0,05 % de K₂HPO₄ y 0,05 % de MgSO₄·7H₂O. El pH del medio se ajusta a 7,5 antes de la esterilización. El cultivo de siembra se incuba a 37°C durante

25 24 horas en un sacudidor rotatorio (250 rpm). Se transfieren 2 ml del cultivo a un Erlenmeyer de 500 ml que contiene 100 ml de un medio de fermentación constituido por 3 % de harina de soja, 2 % de almidón de maíz, 1 % de CaCO₃ y 0,33 % de MgSO₄·7H₂O. La producción de antibiótico alcanza un máximo al

30



1 cabo de 3-6 días sacudiendo a 28°C.

5 La actividad antibiótica en el caldo de fermentación se determina por el ensayo de difusión en disco de papel-agar empleando Bacillus subtilis PC IV219 y Klebsiella pneumoniae A20680. Todos los componentes del complejo Bu 1975 (A₁, A₂, B, C₁ y C₂) presentan actividad contra B. subtilis PC IV219 pero solamente dos componentes, C₁ y C₂, son activos contra K. pneumoniae A20680.

10 La productividad de los componentes C con respecto a los otros componentes difiere de unas variedades a otras. En la fermentación en matraz sacudido, la variedad C532-B2 produjo 50-100 mcg/ml de los componentes C. Esto representa alrededor del 30-50 % de la bioactividad total determinada con B. subtilis. Otras variedades producían menor cantidad de componentes C que la variedad C532-B2.

15 El caldo recogido se filtró empleando un auxiliar de filtración. La bioactividad del filtrado (pH 8,0) se absorbió mediante una columna de Amberlite IRC-50 (forma NH₄⁺). La columna se lavó con agua y después se desarrolló con solución de NH₄OH 1 N. Los eluatos activos se combinaron, se concentraron a vacío y se extrajeron con n-butanol para separar el componente B del concentrado. Se separó la capa acuosa y se aplicó a una columna de Amberlite CG-50 (forma NH₄⁺). La columna se lavó con agua y solución de NH₄OH N/4 sucesivamente y la actividad se eluyó con NH₄OH N/2; recogién dose el eluato fraccionadamente. Los componentes activos se eluyeron en este orden: A₂, A₁, C₂ y C₁, aunque con superposición considerable de los mismos. La separación completa de cada componente se consiguió después de repetir la cromatografía en columna de CG-50.

20

25

30



1 Como indica la Tabla IV, se ha encontrado que dos sis-
temas de cromatografía en capa fina (CCF), a saber S-110 y
S-117, resultan adecuados para diferenciar los componentes
A₁ y A₂ de los componentes C₁ y C₂. Cuando el sistema S-115
5 se desarrolla durante 16 horas, permite separar el A₁ del A₂
y el C₁ del C₂.

Los componentes A₁ y A₂ fueron identificados como ambu-
tirosinas A y B, respectivamente, por sus propiedades físico-
químicas (CCF, IR y RMN) y su espectro antibacteriano. El
10 complejo antibiótico que se identificó como lasambutirosinas
A y B ha sido aislado en el programa de selección y se ha em-
pleado como referencia en este estudio.

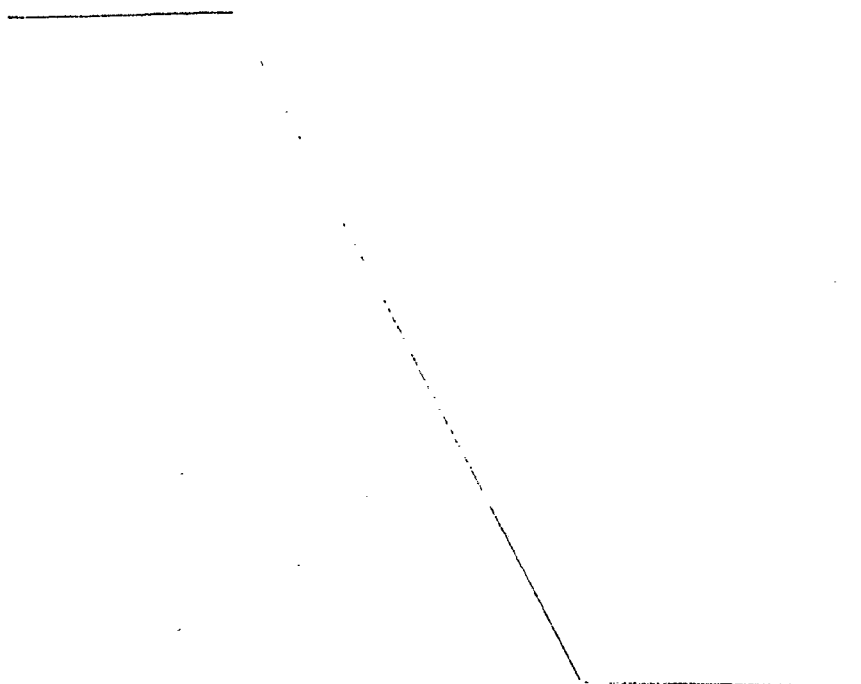
Las siguientes descripciones se refieren fundamental-
mente a los componentes C₁ y C₂ del antibiótico Bu 1975.

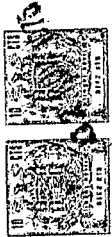
15

20

25

30





TAULA IV

Cromatografia en capa fina de los componentes del Bu. 1975

Sistema	Placa	Sistema disolvente	Rf			
			A ₁	A ₂	C ₁	C ₂
S-110*	gel de sílice	CHCl ₃ -CH ₃ OH - 28 % NH ₄ OH - H ₂ O (1 : 4 : 2 : 1)	0,41	0,41	0,51	0,51
S-117	gel de sílice	CHCl ₃ -CH ₃ OH - 28 % NH ₄ OH (1 : 3 : 2)	0,20	0,20	0,26	0,26
S-115**	alúmina	CHCl ₃ -CH ₃ OH - 28 % NH ₄ OH (2 : 1 : 1), fase superior	3,7 ^{cm}	0,2 ^{cm}	5,3 ^{cm}	0,5 ^{cm}

* Desarrollado tres veces.

** Dieciseis horas de desarrollo, la situación es mostrada en cm a partir del origen.

1

5

10

15

20

25

30

TABLA IV

Cromatografía en capa fina de los compo

Sistema	Placa	Sistema disolvente
S-110 [*]	gel de sílice	CHCl ₃ -CH ₃ OH - 28 % NH ₄ OH - H ₂ O (1 : 4 : 2 : 1)
S-117	gel de sílice	CHCl ₃ -CH ₃ OH - 28 % NH ₄ OH (1 : 3 : 2)
S-115 ^{**}	alúmina	CHCl ₃ -CH ₃ OH - 28 % NH ₄ OH (2 : 1 : 1), fase superior

* Desarrollado tres veces.

** Dieciseis horas de desarrollo, la situación es mostrada en cm

20

25

30

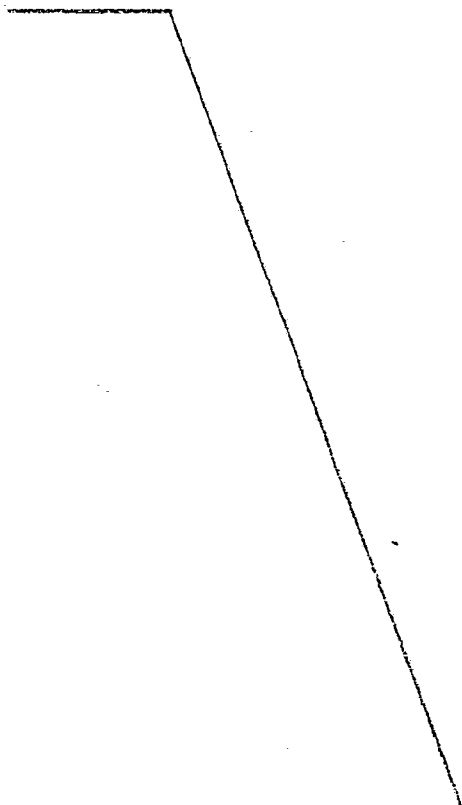


TABLA IV

fa en capa fina de los componentes del Bu 1975

Sistema disolvente	Rf			
	A ₁	A ₂	C ₁	C ₂
H ₃ OH - 28 % NH ₄ OH - H ₂ O 1 : 4 : 2 : 1)	0,41	0,41	0,51	0,51
H ₃ OH - 28 % NH ₄ OH 1 : 3 : 2)	0,20	0,20	0,26	0,26
H ₃ OH - 28 % NH ₄ OH : 1), fase superior	3,7 ^{cm}	0,2 ^{cm}	5,3 ^{cm}	0,5 ^{cm}

La situación es mostrada en cm a partir del origen.





1 Los componentes C₁ y C₂ son bases sólidas amorfas blan-
cas, fácilmente solubles en agua, ligeramente solubles en me-
tanol y etanol y prácticamente insolubles en n-butanol, ace-
tona y otros disolventes orgánicos. Ambos componentes dan
5 reacciones positivas con los reactivos ninhidrina y antrona
pero son negativas en las reacciones de Tollens, Fehling y
Sakaguchi.

Se ha producido el dicarbonato del C₁. Funde a unos
155°C (con descomposición), $[\alpha]_D^{25} = +26,7^\circ$ (c = 1,0, agua)
10 y su análisis como C₂₁H₄₁N₅O₁₁·2H₂CO₃ es el siguiente:

Calculado: C, 41,63; H, 6,83; N, 10,55

Encontrado: C, 41,52; H, 6,47; N, 10,47.

Se ha preparado el tetra-N-acetato de C₁. Tiene un pun-
to de fusión superior a 250°C, $[\alpha]_D^{24,5} = +26,0^\circ$ (c = 0,5,
15 agua) y su análisis como C₂₁H₄₁N₅O₁₁·(C₂H₂O)₄·3/2H₂O es el
siguiente:

Calculado: C, 47,40; H, 7,13; N, 9,53

Encontrado: C, 47,30; H, 7,47; N, 9,65.

Se ha preparado el dicarbonato del componente C₂. Funde
20 a 172-178°C (con descomposición), $[\alpha]_D^{25} = +30,0^\circ$ (c = 1,0,
agua) y su análisis como C₂₁H₄₁N₅O₁₁·2H₂CO₃ es el siguiente:

Calculado: C, 41,63; H, 6,83; N, 10,55

Encontrado: C, 41,22; H, 6,67; N, 10,82.

También se ha preparado el tetra-N-acetato de C₂. Tie-
25 ne un punto de fusión superior a 250°C, $[\alpha]_D^{24,5} = +43^\circ$
(c = 0,5, agua) y su análisis como C₂₁H₄₁N₅O₁₁·(C₂H₂O)₄·H₂O
es el siguiente:

Calculado: C, 47,99; H, 7,08; N, 9,65

Encontrado: C, 48,09; H, 7,20; N, 9,42.

30



1 Los antibióticos C₁ y C₂ presentan absorción terminal
 solamente en la región ultravioleta. Los espectros infrarro-
 5 jos (IR) de C₁ y C₂ son bastante similares a los de la ambu-
 tirosina A y B. El espectro de resonancia magnética nuclear
 (RMN) del C₁ presenta dos protones anoméricos a δ 5,28 (s)
 y 6,10 (d, J = 3,5Hz) ppm, siendo la señal del campo infe-
 rior diferente de la del espectro RMN del C₂ que presenta los
 protones anoméricos a δ 5,28 (s) y 5,98 (d, J = 3,5Hz) ppm.
 Se ha observado una diferencia similar en el desplazamiento
 10 químico de los segundos protones anoméricos en los espec-
 tros RMN de lasambutirosinas A y B. En la Tabla V se encuen-
 tran los datos RMN comparativos de C₁ y C₂ conambutirosina
 A y B. La Tabla V indica que la relación de protones inte-
 15 gulares en las regiones superior (δ 1,2-2,4 ppm) e inferior
 (δ 2,5-4,4 ppm) de metilenmetino es de 6:18 para los compo-
 nentes C₁ y C₂ en contraste con una relación de 4:19 para las
 ambutirosinas A y B.

TABLA V

20 Datos comparativos RMN de los componentes C₁ y C₂ con las am-
butirosinas A y B
 (60 MHz en D₂O, pH 2,0)

Desplaza- miento quí- mico (δ, ppm)	Número de protones y tipo de señales			
	Bu 1975C ₁	Bu 1975C ₂	Ambutiro- sina A	Ambutiro- sina B
1,2-2,4	6H (m)	6H (m)	4H (m)	4H (m)
2,5-4,4	18H (m)	18H (m)	19H (m)	19H (m)
5,16	-	-	1H (s)	1H (s)
5,28	1H (s)	1H (s)	-	-
5,98	-	1H(d, J=3,5Hz)	-	1H(d, J=3,6Hz)
30 6,10	1H(d, J=3,5Hz)	-	1H(d, J=3,6Hz)	-



1 Para ilustrar su espectro antibacteriano, se han deter-
 minado las concentraciones mínimas de inhibición (CMI) de C₁
 y C₂ contra una amplia variedad de bacterias. Se empleó el
 método de dilución en agar dos veces sobre placas de agar nu-
 5 tritivo (Eiken). Se utilizó el aparato multi-inoculante de
 Steer. El tamaño del inoculum fue normalizado como una dilu-
 ción 10⁻⁴ de un cultivo de una noche de los organismos de en-
 sayo en caldo de infusión de corazón (Difco). Se ensayaron
 variedades de Mycobacterium sobre placas conteniendo un me-
 10 dio de agar nº 1001 (3 % de glicerol, 0,3 % de L-glutamato
 sódico, 0,2 % de peptona, 0,31 % de Na₂HPO₄, 0,1 % de KH₂PO₄,
 0,005 % de citrato amónico, 0,001 % de MgSO₄ y 1,5 % de agar),
 siendo el tamaño del inoculum una dilución 10⁻³ de un cultivo
 de una noche. Los resultados se encuentran en la Tabla VI
 15 junto con los de los antibióticos de referenciaambutirosina
 A y kanamicina que fueron ensayados con fines comparativos.

TABLA VI

Espectros antibacterianos de los componentes C₁ y C₂

Organismos de ensayo	CMI (mcg/ml)			
	C ₁	C ₂	Kanamicina	Ambutiro- sina A
<u>Staphylococcus aureus</u> Smith	0,4	0,8	0,2	0,4
209P "	3,1	3,1	0,8	3,1
" "				
25 A20239	1,6	1,6	50	1,6
<u>Sarcina lutea</u> PCI 1001	6,3	6,3	3,1	6,3
<u>Escherichia coli</u> NIHJ	0,8	0,8	0,8	0,8
" " Juhl	0,8	0,8	0,8	0,8
" " A15169	0,8	1,6	0,8	0,8
30 " " A20363	0,8	0,8	>100	0,8



TABLA VI (continuación)

Organismos de ensayo	CMI (mcg/ml)			
	C ₁	C ₂	Kanamicina	Ambutirosina A
5 <u>Escherichia coli</u> A9844	0,4	0,8	0,8	0,4
" " A20365	0,2	0,2	100	0,2
" " K12	0,4	0,8	0,8	0,4
" " A20664	0,8	3,1	3,1	0,8
" " A20665	0,4	0,8	100	0,4
10 " " A9535	0,4	0,8	0,8	0,8
" " A15148	0,8	0,8	0,8	0,8
" " A15164	0,4	0,8	0,8	0,8
" " A15170	0,8	1,6	1,6	0,8
" " A20102	0,4	0,8	0,8	0,8
15 " " A20684	0,8	0,8	0,4	0,8
" " A20683	0,8	1,6	100	25
<u>Klebsiella pneumoniae</u> D11	0,1	0,2	0,2	0,2
" " A20680	0,8	1,6	100	50
<u>Klebsiella</u> sp. A9661	0,8	0,8	0,8	1,6
20 " A9662	0,8	0,8	0,8	0,8
<u>Proteus vulgaris</u> A9436	0,2	0,2	0,4	0,1
" " A9526	0,4	0,4	0,4	0,2
" " A9699	1,6	1,6	0,8	0,8
" " ATCC9920	0,4	0,4	0,4	0,4
25 " " A9539	0,2	0,4	0,2	0,2
" " A9716	1,6	1,6	0,8	1,6
<u>Proteus morganii</u> A9553	0,4	0,4	0,8	1,6
" " A20031	0,8	0,8	3,1	0,8
" " A9636	1,6	1,6	1,6	1,6
30 " " A15153	1,6	1,6	1,6	1,6



1

TABLA VI (continuación)

				CMI (mcg/ml)			
<u>Organismos de ensayo</u>				<u>C₁</u>	<u>C₂</u>	<u>Kanami- cina</u>	<u>Ambuti- rosina A</u>
5	<u>Proteus</u> <u>morganii</u>	A15166		0,4	0,4	0,2	0,4
	"	"	A20455	1,6	1,6	1,6	1,6
	"	"	A20457	1,6	1,6	1,6	1,6
	<u>Proteus</u> <u>rettgeri</u>	A9637		0,8	0,8	0,8	0,8
	<u>Proteus</u> <u>inconstans</u>	A20615		1,6	1,6	0,8	0,8
10	<u>Proteus</u> <u>mirabilis</u>	A9554		0,8	0,8	0,4	1,6
	"	"	A9900	0,4	0,8	0,4	1,6
	"	"	A20119	1,6	1,6	0,8	3,1
	"	"	A20454	1,6	1,6	0,8	0,8
	<u>Serratia</u> <u>marcescens</u>	A20019		1,6	6,3	0,8	6,3
15	<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u>	D15		3,1	3,1	25	6,3
	"	"	A9923	6,3	6,3	50	12,5
	"	"	A9930	0,4	0,4	12,5	1,6
	"	"	D113	25	25	>100	>100
	"	"	A15150	12,5	12,5	25	12,5
20	"	"	A15194	6,3	3,1	25	6,3
	"	"	A20479	6,3	12,5	100	12,5
	"	"	A20616	6,3	12,5	50	12,5
	"	"	A20653	100	25	>100	>100
	"	"	A9843	6,3	3,1	100	25
	"	"	A20717	6,3	6,3	50	12,5
25	"	"	A20718	6,3	6,3	50	12,5
	"	"	D114	6,3	6,3	25	12,5
	<u>Pseudomonas</u> sp.	A20355		3,1	3,1	50	6,3
	"	A20358		3,1	3,1	12,5	6,3
30	"	A20368		12,5	12,5	25	12,5



TABLA VI (continuación)

Organismos de ensayo	CMI (mcg/ml)			
	C ₁	C ₂	Kanamicina	Ambutirosina A
<u>Pseudomonas</u> sp. A20598	12,5	12,5	25	12,5
" A20600	6,3	6,3	>100	12,5
" A20603	25	25	>100	100
" A20618	>100	>100	>100	>100
" A20594	12,5	12,5	50	12,5
<u>Mycobacterium</u> 607	0,4	0,4	0,4	0,4
<u>Mycobacterium</u> phlei	0,2	0,2	0,4	0,2
<u>Mycobacterium</u> ranae	0,4	0,4	0,4	0,4

Los componentes C₁ y C₂ presentan esencialmente el mismo nivel de potencia intrínseca. Exhiben un amplio espectro de actividad antibacteriana contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluidas las que son resistentes a los antibióticos aminoglicosidos comúnmente empleados como estreptomycin, neomicina, kanamicina y gentamicina. En general, la actividad y el espectro de los componentes C₁ y C₂ son similares a los de la ambutirosina. Sin embargo, los componentes C₁ y C₂ presentan un espectro más amplio que la ambutirosina, ya que inhiben a ciertos organismos resistentes a la ambutirosina y presentan una actividad anti-pseudomonas algo mayor que la ambutirosina.

La actividad del componente C₁ se comparó con la de los antibióticos aminoglicosidos contra un grupo seleccionado de organismos que comprendía dos variedades normales sensibles (S. aureus Smith, E. coli Juhl), seis organismos resistentes (S. aureus, E. coli, K. pneumoniae) y diez especies de Pseudomonas. Los resultados se encuentran en la Tabla VII. Se dedu-



1 ce de los resultados de la Tabla VII que el componente C_1 es
activo contra diversos tipos de organismos resistentes, cuyos
mecanismos de resistencia son conocidos o se cree que consis-
ten en fosforilación, acetilación y adenilación.

5

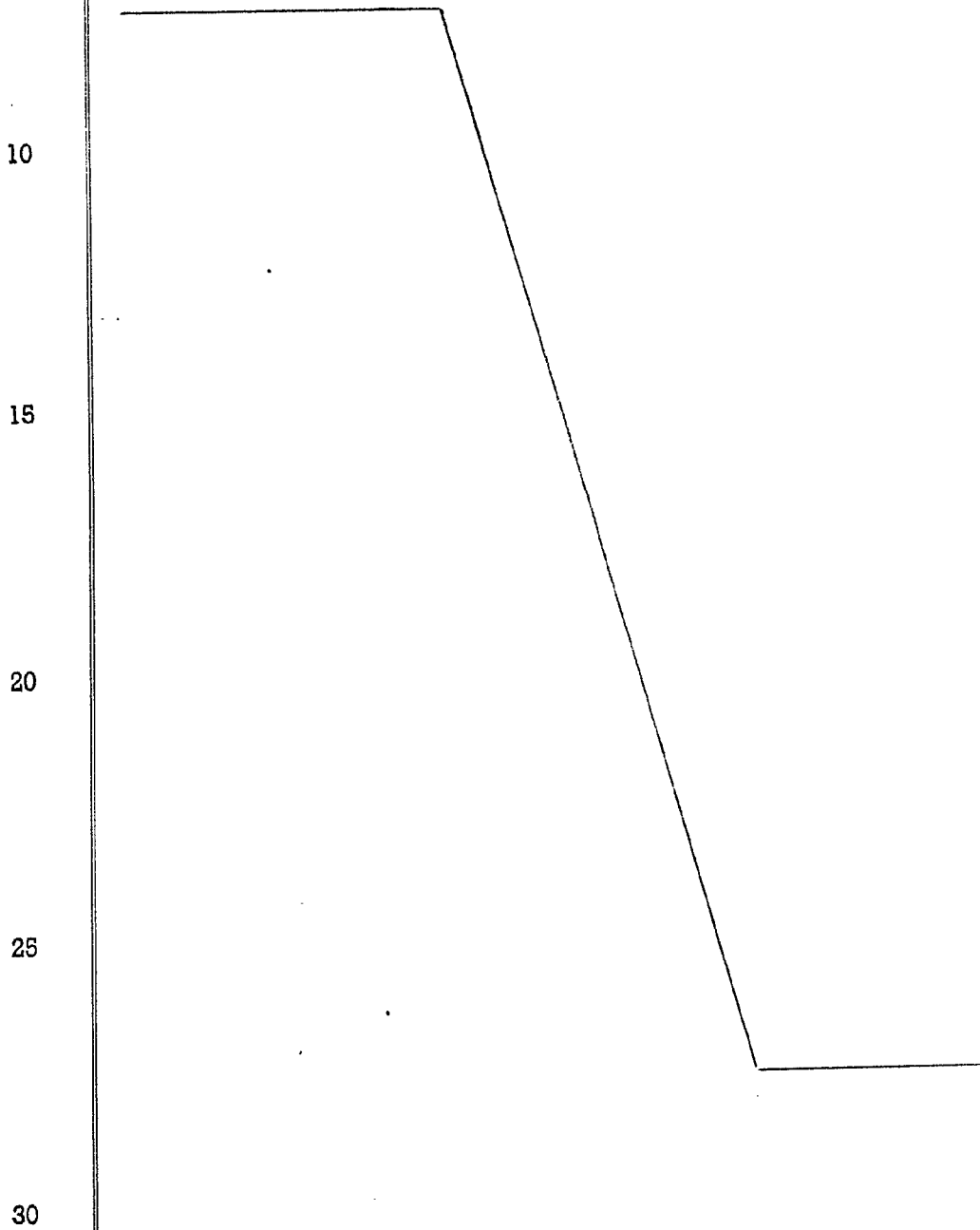




TABLA VII

Actividad del componente C, contra los organismos resistentes a los aminoglicosidos

Organismos	C ₁	MIC (mcg/ml)					
		Ambutirosina A	Kanamicina A	Estreptomina Cina	Neomicina B	Gentamicina C	
<u>S. aureus</u> Smith	0,4	0,4	0,2	0,8	0,4	0,2	
" " A20239	1,6	1,6	50	>100	50	0,4	
<u>E. coli</u> Juhl	0,8	0,8	0,8	6,3	1,6	0,4	
" " A20363	0,8	0,8	100	25	100	0,8	
" " A20664	0,8	0,8	3,1	6,3	3,1	0,4	
" " A20665	0,4	0,4	100	25	50	0,4	
" " A20683	0,8	25	100	100	100	25	
<u>K. pneumoniae</u> A20680	0,8	50	100	>100	>100	50	
<u>P. aeruginosa</u> D15	3,1	6,3	25	25	3,1	3,1	
" " D113	25	>100	>100	>100	50	12,5	
" " D114	6,3	12,5	25	-	100	6,3	
" " A9843	6,3	25	100	25	100	6,3	
" " A20653	100	>100	>100	100	>100	6,3	
" " A20718	6,3	12,5	50	>100	50	>100	
<u>Pseudomonas</u> sp. A20355	3,1	6,3	50	100	50	0,8	
" " A20358	3,1	6,3	12,5	25	100	6,3	
" " A20603	25	100	>100	>100	>100	100	
" " A20618	>100	>100	>100	>100	>100	>100	

1

5

10

15

20

25

30

TABLA VII

Actividad del componente C₁ contra los organi

	Organismos	C ₁	Ambutirosina A	K
1				
5	<u>S. aureus</u> Smith	0,4	0,4	
	" " A20239	1,6	1,6	
	<u>E. coli</u> Juhl	0,8	0,8	
	" " A20363	0,8	0,8	
	" " A20664	0,8	0,8	
10	" " A20665	0,4	0,4	
	" " A20683	0,8	25	
	<u>K. pneumoniae</u> A20680	0,8	50	
	<u>P. aeruginosa</u> D15	3,1	6,3	
	" " D113	25	>100	>
15	" " D114	6,3	12,5	
	" " A9843	6,3	25	
	" " A20653	100	>100	>
	" " A20718	6,3	12,5	
	<u>Pseudomonas</u> sp. A20355	3,1	6,3	
20	" " A20358	3,1	6,3	
	" " A20603	25	100	>
	" " A20618	> 100	>100	>
25				
30				

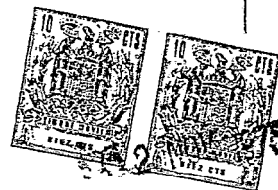
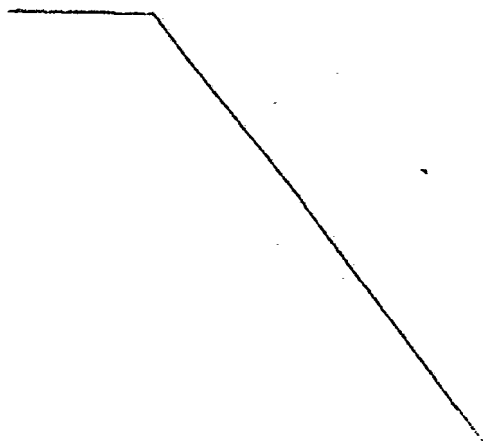


TABLA VII

1 componente C₁ contra los organismos resistentes a los aminoglicosidos

C ₁	MIC (mcg/ml)				
	Ambutirosina A	Kanamicina A	Estreptomina cina	Neomicina B	Gentamicina C
0,4	0,4	0,2	0,8	0,4	0,2
1,6	1,6	50	>100	50	0,4
0,8	0,8	0,8	6,3	1,6	0,4
0,8	0,8	100	25	100	0,8
0,8	0,8	3,1	6,3	3,1	0,4
0,4	0,4	100	25	50	0,4
0,8	25	100	100	100	25
0,8	50	100	>100	>100	50
3,1	6,3	25	25	3,1	3,1
25	>100	>100	>100	50	12,5
6,3	12,5	25	-	100	6,3
6,3	25	100	25	100	6,3
100	>100	>100	100	>100	6,3
6,3	12,5	50	>100	50	>100
3,1	6,3	50	100	50	0,8
3,1	6,3	12,5	25	100	6,3
25	100	>100	>100	>100	100
>100	>100	>100	>100	>100	>100





1 La actividad in vivo y la toxicidad del componente C
fueron evaluadas como sigue:

5 El componente C₁ y laambutirosina A (con fines com-
parativos) se valoran in vivo en infecciones experimentales
de ratones. Las bacterias patógenas empleadas fueron S. aureus
Smith, E. coli NIHJ y K. pneumoniae A20680 (un organismo re-
sistente a la kanamicina y laambutirosina). Los ratones fue-
ron atacados intraperitonealmente con los agentes patógenos
en una suspensión al 5 % de mucina gástrica de cerdo. La do-
sis de ataque fue controlada en un valor de 100 x DL₅₀. In-
mediatamente después del ataque bacteriano se realizó un solo
tratamiento subcutáneo con el antibiótico. Se utilizó un gru-
po de 5 ratones para un nivel de dosificación. Los animales
se observaron durante 5 días para determinar la dosis curati-
va media (DC₅₀).

15 Los resultados de los experimentos in vivo están mos-
trados en la Tabla VIII. El C₁ proporciona una excelente pro-
tección en ratones contra las tres infecciones ensayadas. La
ambutirosina A presenta in vivo una actividad comparable a la
del componente C₁ contra las infecciones por S. aureus y E.
20 coli sensibles pero es inactiva contra la infección por K.
pneumoniae resistente.

25 La toxicidad aguda del componente C₁ fue determinada
en ratones. La DL₅₀ por vía intravenosa fue de 720 mg/kg para
el sulfato de C₁ y superior a 1000 mg/kg para la base libre
C₁. En un experimento comparativo, se encontró que los valo-
res de la DL₅₀ por vía intravenosa del sulfato de kanamicina
y del sulfato deambutirosina eran de 280 mg/kg y 720 mg/kg,
respectivamente.

30



1

TABLA VIII

Actividad in vivo del C₁[★]

Infección con S. aureus Smith

	<u>Dosis (subcutánea)</u>	<u>C₁</u>	<u>Ambutirosina A</u>
5	25 mg/kg	5/5 [★]	5/5 [★]
	12,5	5/5 [★]	5/5 [★]
	6,25	4/5 [★]	4/5 [★]
	3,12	3/5 [★]	3/5 [★]
	1,56	2/5 [★]	1/5 [★]
10	DC ₅₀	2,5 mg/kg	2,9 mg/kg

Infección con E. coli NIHJ

	<u>Dosis (subcutánea)</u>	<u>C₁</u>	<u>Ambutirosina A</u>
	25 mg/kg	5/5 [★]	5/5 [★]
15	12,5	5/5 [★]	4/5 [★]
	6,25	4/5 [★]	3/5 [★]
	3,12	2/5 [★]	3/5 [★]
	1,56	0/5 [★]	1/5 [★]
	DC ₅₀	3,8 mg/kg	3,7 mg/kg

20

Infección con K. pneumoniae A20680

	<u>Dosis (subcutánea)</u>	<u>C₁</u>	<u>Ambutirosina A</u>
	100 mg/kg	-	1/5 [★]
	50	-	1/5 [★]
25	25	5/5 [★]	0/5 [★]
	12,5	3/5 [★]	0/5 [★]
	6,25	2/5 [★]	0/5 [★]
	3,12	2/5 [★]	0/5 [★]
	1,56	1/5 [★]	-
30	DC ₅₀	6,3 mg/kg	>100 mg/kg

30

★ Número de supervivientes/número de infectados.

★★ Determinado por el método de J.L. Reed y colaboradores,



1 American J. Hygiene, 27, 493-497 (1938).

5 En los últimos años se ha progresado mucho en la elucidación de los mecanismos de la resistencia con intervención del factor R a los antibióticos aminoglicosidos. Ahora se sabe que los organismos resistentes producen enzimas bacterianas que inactivan a los antibióticos aminoglicosidos por acetilación (véase J. Antibiotics, Ser. A 20: 136-141, 1967; J. A. Antibiotics 21 (1): 13-21, 1968; Biochemistry 10 (10): 1787-1796, 1971; y Biochemistry, 11: 761-765, 1972), fosforilación (véase Science 157: 1559-1561; J. Antibiotics 21: 13-21, 1968; J. Antibiotics 21: 154-155, 1968; y J. Bacteriol. 100 (2): 1144-1146, 1969) y adenilación (véase J. Antibiotics 21: 81-82, 1968; FEBS Letters 14 (5): 293-296, 1971; y J. Antibiotics, 24 (12): 911-912, 1971). Se sabe que la kanamicina fosforilasa reacciona con las kanamicinas, neomicinas y paromomicinas en el grupo 3'-hidroxi para dar productos fosforilados bioinactivos (véase Ann. N.Y. Acad. Sci. 182:226-233, 1971). Las gentamicinas C₁, C₂ y C_{1a}, la tobramicina (véase Antimicrobial Agent Chemoterapy 1970: 309-313, 1971) y la didesoxikanamicina B (véase J. Antibiot. 24: 485-487, 1971) que no contienen un grupo hidroxilo en la posición 3', son incapaces de inactivación fosforilativa. Laambutirosina no es inactivada por la kanamicina fosforilasa (datos no publicados) aunque contiene un grupo 3'-hidroxilo. La resistencia de laambutirosina a esta inactivación enzimática se cree que es debida a la sustitución acílica de la función 1-amino con ácido L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutírico. También ocurre esto con los componentes C₁ y C₂ que presentan actividad contra los organismos resistentes a la kanamicina que producen kanamicina fosforilasa. Esto es bastante natural porque los componentes

10

15

20

25

30



1 C₁ y C₂ presentan la estructura de la 4'-desoxiambutirosina
A y B.

Otro hallazgo interesante es que los componentes C₁ y
C₂ inhiben el crecimiento de K. pneumoniae A20680 y E. coli
5 A20683.

El K. pneumoniae A20680 es originado de la variedad
de Klebsiella tipo 22 n^o 3038); y el E. coli A20683 es ori-
ginado de E. coli JR66/W677 (véase Febs. Letters 14 (5): 293-
296, 1971). Ambos son conocidos por inactivar a los compo-
10 nentes de la gentamicina C (véase FEBS Letters, 14 (5): 293-
296, 1971) y a la 3',4'-didesoxikanamicina B (véase J. Anti-
biotics 24.(12): 911-912, 1971) por adenilación y a la kana-
micina, neomicina y estreptomycin por fosforilación (véase
FEBS Letters 14 (5): 293-296, 1971). Como se observa en las
15 Tablas VI y VII, laambutirosina carece de actividad sobre
estos tipos de organismos resistentes.

Como ya se ha dicho, el complejo antibiótico Bu 1975
y especialmente los componentes C₁ y C₂ purificados son va-
liosos como agentes antibacterianos.

20 Los componentes C₁ y C₂ pueden ser administrados por
vía oral como tratamiento auxiliar para la esterilización pre-
operatoria del intestino. La flora aerobia y anaerobia sus-
ceptible a estas drogas es reducida en el intestino grueso.
Cuando van acompañados de una limpieza mecánica adecuada, los
25 componentes C₁ y C₂ son útiles en la preparación de la ciru-
gía del colon.

Los componentes C₁ o C₂ pueden ser empleados en el
tratamiento de las infecciones bacterianas sistémicas por
administración parenteral de las drogas respectivas, 3 ó 4
30 veces al día, en una dosis diaria total de 250 mg a 3000 mg.



1 Un régimen de dosificación preferido generalmente efectivo
comprende de 5,0 a 7,5 mg de la droga por kg de peso corpo-
ral, cada 12 horas.

5 Los compuestos C_1 , C_2 y sus sales de adición de ácido
farmacéuticamente aceptables constituyen las realizaciones
preferidas de esta invención. Las formas de monosulfato, di-
sulfato, deshidratada, monohidratada y polihidratada de los
antibióticos C_1 y C_2 son especialmente preferidas.

10 En el sentido utilizado aquí, el término "sal de adi-
ción de ácido farmacéuticamente aceptable" significa una mo-
nosal, disal, trisal o tetrasal formada por interacción de
1 mol de C_1 o de C_2 con 1 a 4 moles de un ácido farmacéuti-
camente aceptable. Estos ácidos son el ácido acético, clor-
hídrico, sulfúrico, maleico, fosfórico, nítrico, bromhídrico,
15 ascórbico, málico y cítrico y los otros ácidos comúnmente em-
pleados para formar sales de los productos farmacéuticos que
contienen grupos amina.

20 Amberlite IRC-50 es el nombre comercial de una resina
cambiadora catiónica, débilmente ácida, del tipo carboxílico-
polimetacrílico.

Amberlite CG 50 es el nombre comercial para la
calidad cromatográfica de una resina cambiadora catióni-
ca débilmente ácida de un tipo carboxílico - polimetacrí-
lico.

25 Los siguientes ejemplos se incluyen solamente con
el objeto de ilustrar la presente invención y no deben ser
considerados como limitativos de la misma en ningún
aspecto.

30



1

EJEMPLO 1

5

10

15

20

25

30

Se utiliza un cultivo inclinado de ágar de B. circulans de la variedad C532-B2 para inocular 100 ml de un medio número YGP-1 (que contiene 1,5 % de glucosa, 0,5 % de polipeptona, 0,2 % de extracto de levadura, 0,05 % de K_2HPO_4 y 0,05 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad. Este cultivo de siembra se incuba a 37°C durante veinticuatro horas en un sacudidor rotatorio (a 250 revoluciones por minuto) y después cada 2 ml del cultivo se transfieren a un volumen de 100 ml de medio de fermentación número 132 (que contiene 3 % de harina de soja, 2 % de almidón de maiz, 1 % de carbonato cálcico y 0,33 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$).

Al cabo de seis días de sacudir el cultivo a 28°C, el análisis del caldo de fermentación por el método del disco de papel (8 mm) da por resultado una zona de inhibición de 25 mm sobre una placa de B. subtilis variedad PCI 219 y una zona de 16 mm sobre una placa de K. pneumoniae variedad A20680. Los caldos de fermentación combinados (procedentes de 200 matraces, con un volumen total de 17 litros) se filtran y absorben en una columna de Amberlite IRC-50 (forma NH_4^+ , 500 ml). La columna se lava con agua y después se eluye con 2,2 litros de una solución 1 N de hidróxido amónico. Los eluatos activos se combinan, después se concentran a vacío y se extraen con n-butanol.

Por evaporación del extracto butanólico se obtienen 1,3 g de un sólido crudo (componente B).

La capa acuosa se concentra a vacío hasta unos 30 ml y esta solución se aplica a una columna de Amberlite



1 CG-50 (en la forma NH_4^+).

La columna se lava con 500 ml de solución N/10 de hidróxido amónico y 700 ml de solución N/4 de hidróxido amónico, sucesivamente y la bioactividad se eluye con una solución N/2 de hidróxido amónico.

5 El eluato se recoge en fracciones y se traza por bioensayo, reacción con ninhidrina y cromatografía en capa fina.

Los componentes activos se eluyen en el orden siguiente: A_2 , A_1 , C_2 y C_1 .

Tubo nº	Volumen	CCF	Relación estimada	Sólido
69-87	200 ml	$A_2 + A_1$	4 : 6	228 mg
88-111	250	$A_1 + C_2$	3 : 7	193
112-159	500	C_1	-	201

15 La cromatografía en columna repetida (CG-50, forma NH_4^+) de los sólidos segundo y tercero da preparaciones puras de 120 mg de C_2 y 180 mg de C_1 , respectivamente.

EJEMPLO 2

20 Se ensaya el organismo B. circulans variedad C532-B2-H48, obtenido por la técnica de aislamiento de monoesporas a partir de la variedad padre de C532-B2. Una fermentación en matraz sacudido similar a la del Ejemplo 1 da una potencia máxima al quinto día (pH 9,3), presentando una zona de inhibición de 30 mm sobre una placa de B. subtilis PCI 219 y una zona de 21 mm sobre una placa de K. pneumoniae A20680. El resultado de la determinación indica que el caldo contenía alrededor de 150 mcg/ml de componente A y alrededor de 100 mcg/ml del componente C.

30



1

EJEMPLO 3

5

Se utilizó B. circulans variedad C308-B4 como cultivo de siembra y se realizó una fermentación en matraz sacudido como en el Ejemplo 1. El caldo recogido (18 litros) contenía 75 mg de componente A ($A_1 + A_2$), 6,4 del componente B y 75 mg de componente C ($C_1 + C_2$).

10

EJEMPLO 4

Se empleó B. circulans variedad C436-B1 como cultivo de siembra y se realizó la fermentación en matraz sacudido como en el Ejemplo 1. El caldo recogido (20 litros) contenía 71 mg de componente A ($A_1 + A_2$), 4,1 g de componente B y 66 mg de componente C ($C_1 + C_2$).

15

EJEMPLO 5

20

25

30

Se realizaron experiencias de fermentación sumergida y aireada en fermentadores vibratorios de 20 litros. Se empleó B. circulans variedad C532-B2-H48 para inocular 10 litros de medio n° YGP-1 (pH 7,2 después de la esterilización). El cultivo de siembra se agitó a 250 rpm y 35°C, con un caudal de aireación de 10 litros/minuto. Se obtuvo un crecimiento vigoroso al cabo de 11 horas (pH 6,0). A las once horas y media, un litro del cultivo de siembra se transfirió a 10 litros de un medio de fermentación esterilizado n° 132. La fermentación se llevó a cabo a 28°C con una velocidad de aireación de 11,5 litros/minuto. Fueron necesarias frecuentes adiciones de un antiespumante de silicona (KM-70) para controlar la excesiva formación de espuma. La potencia máxima del caldo se alcanzó a las 70 horas (pH 8,2). La determinación diferencial, empleando B. subtilis PCI 219 y K. pneumoniae A20680, dio un valor de 79 mcg/ml del componente A ($A_1 + A_2$) y 49 mcg/ml de componente C ($C_1 + C_2$).



1

EJEMPLO 6

5

10

Se realizó una fermentación a mayor escala en tanques de planta piloto capaces de fermentar unos volúmenes de 100 litros y 300 litros. Las condiciones de fermentación empleadas fueron similares a las del Ejemplo 5, a excepción de que la velocidad de agitación fue de 180 rpm y la temperatura de incubación del medio de fermentación fue de 32°C. Después de 50 horas de fermentación (pH 8,7), la potencia del caldo alcanzó un valor de 95 mcg/ml de componente A y 45 mcg/ml de componente C.

EJEMPLO 7

15

20

25

30

A pH 8,5 se filtraron 650 litros del caldo recogido (procedente de dos tanques de 300 litros) conteniendo alrededor de 20 mcg/ml del componente C y se agitaron con 8,6 litros de Amberlite IRC-50 (forma NH_4^+). Se separó la resina, se lavó con 80 litros de agua y después se eluyó discontinuamente con solución 1 N de NH_4OH (10 litros x 3). Se combinaron los eluatos y se concentraron a vacío a 35-40°C hasta un volumen de unos 500 ml, que contenían 11,3 unidades gramo de componente A y 7,3 unidades gramo de componente C. El concentrado se extrajo con n-butanol para separar el componente B contaminado y la capa acuosa se agitó con 200 ml de Amberlite CG-50 (forma NH_4^+). Se separó la resina, se lavó con 5 litros de agua y después se colocó en la parte superior de una columna CG-50 (forma NH_4^+ , 1500 ml). La columna se desarrolló con 7 litros de NH_4OH N/4. La actividad se eluyó con NH_4OH N/2 y los eluatos se recogieron fraccionadamente. Se obtuvieron 7,2 g del componente A de los tubos números 491-800 y 4,2 g de componente C de los tubos números 931-1370. De los tubos números 801-930 se recuperaron 1,8 g

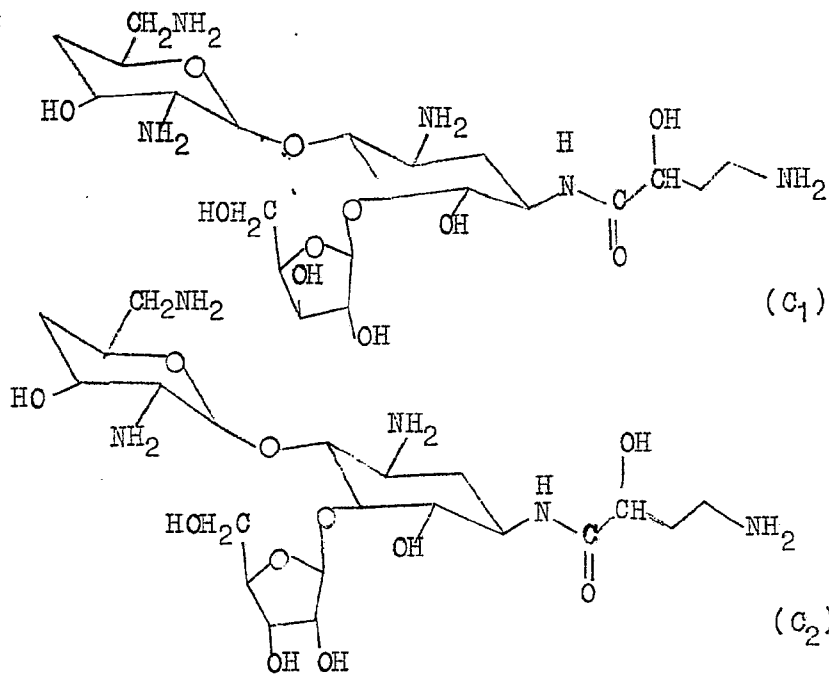


1 de una mezcla de los componentes A y C.

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

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la preparación del nuevo complejo antibiótico de la butirosina (Bu 1975) o de los componentes C₁ o C₂ del mismo, de fórmula:



25 y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable; cuyo procedimiento se caracteriza por producir el complejo antibiótico Bu 1975 por fermentación aerobia empleando el cultivo denominado

Bacillus circulans subsp. n. croceus (A.T.C.C. 21.820)

Bacillus circulans subsp. n. proteophilus (A.T.C.C. 21821) o

Bacillus circulans subsp. n. biotinicus (A.T.C.C. 21822) y

30 de fermentación y, cuando se desea obtener el componente C₁



1 o el componente C_2 , aislando estos últimos de dicho complejo antibiótico Bu 1975.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado además porque dicha fermentación es una fermentación en vasijas sacudidas.

3. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde el aislamiento de los componentes C_1 o C_2 del complejo antibiótico Bu 1975 se realiza por cromatografía en columna.

10 4. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, caracterizado además porque la sal de los componentes C_1 o C_2 es un monosulfato o un disulfato.

5. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, donde el componente C_1 o C_2 está monohidratado o polihidratado.

15 6. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL COMPLEJO ANTIBIOTICO DE LA BUTIROSINA.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de treinta y tres páginas mecanografiadas.

Madrid, 13 septiembre 1973
BERNARDO UNGRIA

p.p.

25

30