



ESPAÑA

ES

424.019
7.3.1974

A1

## PATENTE DE INVENCION

<b>(30) PRIORIDADES</b> <b>(31) NUMERO</b>		<b>(32) FECHA</b>	<b>(33) PAIS</b>
3510/73		9. 3.1973	Suiza
15685/73		8.11.1973	"
16179/73		16.11.1973	"
1493/74		4. 2.1974	"
<b>(47) FECHA DE PUBLICIDAD</b>	<b>(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL</b>	<b>(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA</b>	
	C12D		
<b>(64) TITULO DE LA INVENCION</b>			
PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE SEPTAMICINA.			
<b>(71) SOLICITANTE (S)</b>			
SANDOZ A.G., entidad suiza.			
<b>DOMICILIO DEL SOLICITANTE</b>			
Basilea, Suiza.			
<b>(72) INVENTORES</b>			
Camilla Keller-Juslén, Hamilton De Lisle King y Zoltan Kis'			
<b>(73) TITULARES</b>			
<b>(74) REPRESENTANTE</b>			
D. JAIME GOMEZ-ACEBO Y MODET.			

PATENTE DE INVENCION

Case 100-3955

3700/RA/HP.

*Memoria Descriptiva*

4240191

*sobre:*

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE SEPTAMICINA.

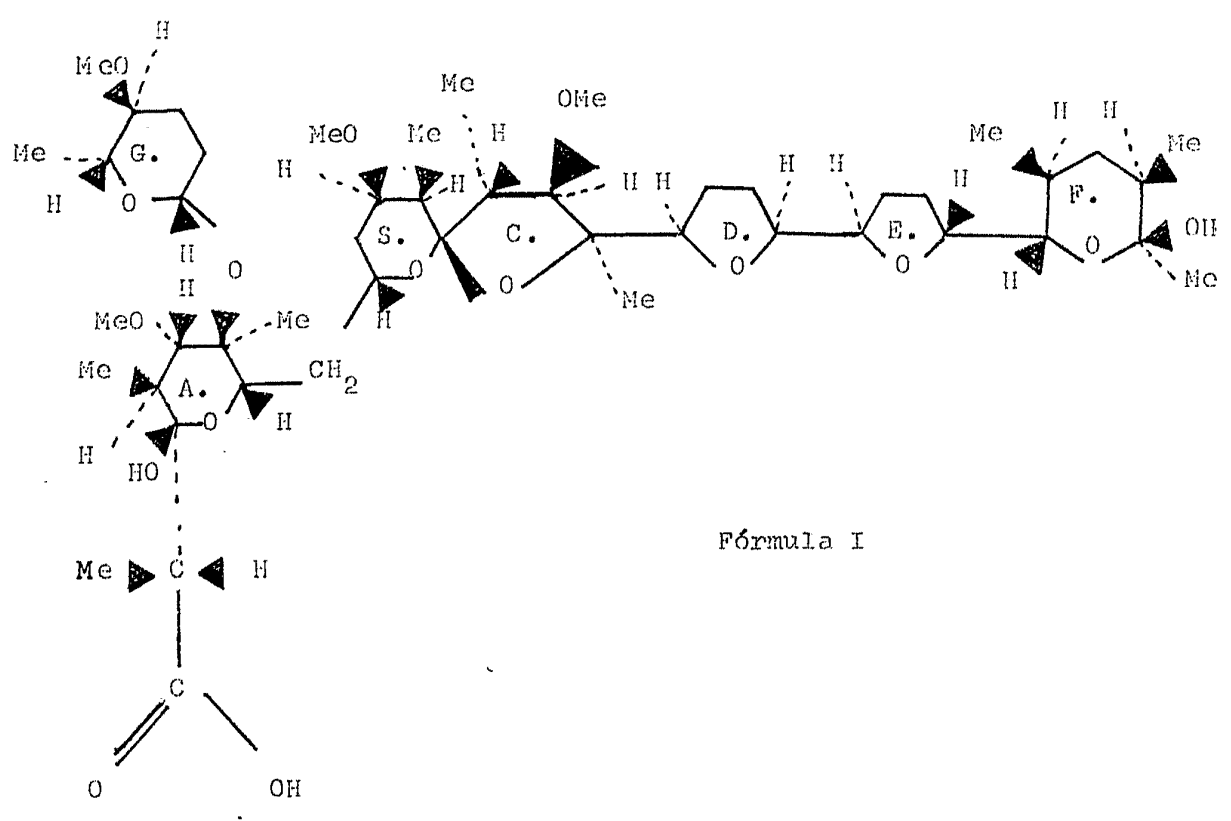
=====

*Solicitante:* SANDOZ, A.G., entidad suiza, residente en Basilea,  
Suiza.

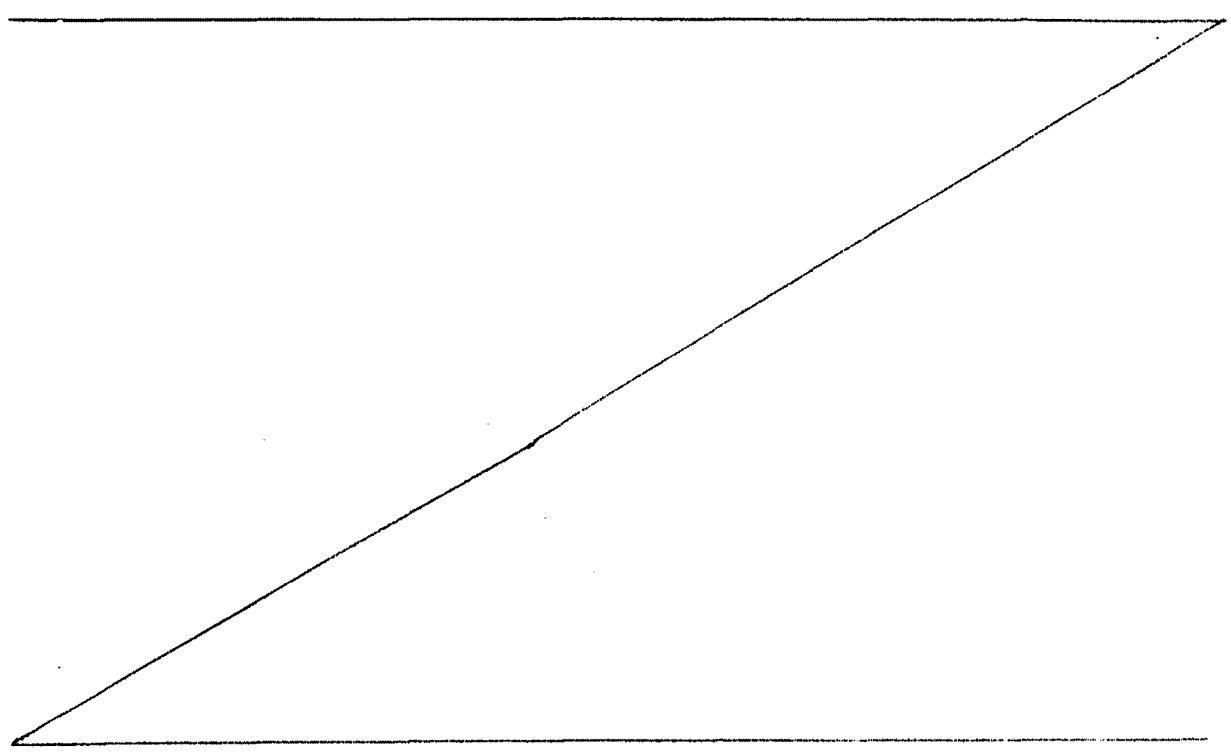
=====

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar un nuevo metabolito.

De acuerdo con la invención se proporciona el nuevo metabolito septamicina de fórmula I,



Fórmula I



en forma libre o en forma de una sal de metal alcalino, de metal alcalinotérreo o de amonio del mismo.

Además, de acuerdo con la invención el nuevo metabolito septamicina, en forma libre o en forma de una sal del mismo, puede obtenerse mediante un procedimiento caracterizado porque se cultiva una cepa de la especie de actinomicetales *Streptomyces hygrosopicus* en contacto con un medio nutritivo, se aísla el metabolito septamicina en forma libre o en forma de una sal de metal alcalino, de metal alcalinotérreo o de amonio, del micelio o del líquido de fermentación, el que se desintegra facultativamente con un aparato Ultraturrax, en forma de por sí conocida mediante métodos de extracción y/o adsorción, y luego se purifica cromatográficamente, mediante cristalización o distribución a contracorriente.

La septamicina en forma libre puede convertirse facultativamente en una forma de sal en forma conocida.

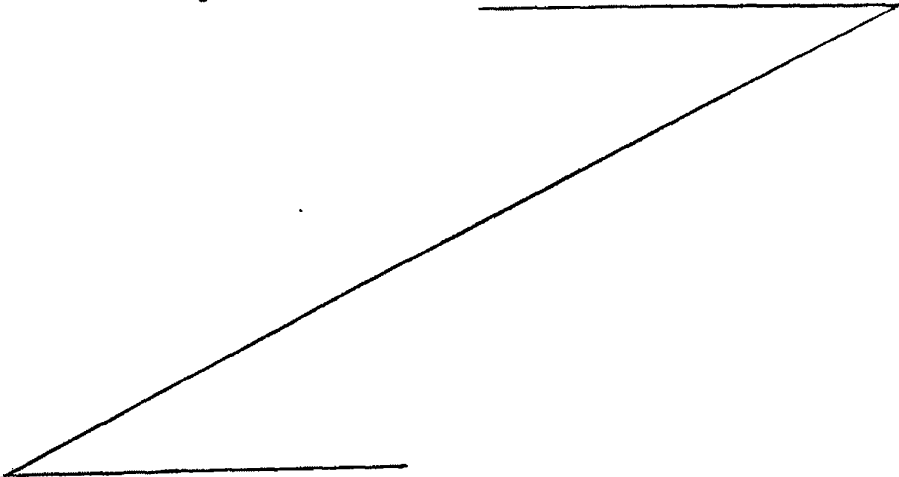
La nueva cepa de *Streptomyces hygrosopicus* (Jensen, 1931) Waksman y Henrici, 1948, fue aislada de una muestra de tierra tomada en Madison, Wisconsin, Estados Unidos, y una muestra de la misma ha sido depositada en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Northern Utilization Research and

Development Division), Peoria, Ill., Estados Unidos, y está disponible para su inspección bajo el número de referencia NRRL 5678.

5 La cepa NRRL 5678 se desarrolla bien sobre medios orgánicos y sintéticos a 27°C y a un valor pH entre 6 y 9. Los esporóforos son ramificados monopodialmente, con espirales apretadas, compactas. A menudo forman racimos apretados que tienen una apariencia pseudoverticilada. Los esporos son ovales, 10 su largo es de 1,0 a 1,2 micras y su ancho de 0,8 a 1,0 micras. Su superficie es verrugosa.

Sobre algunos medios se observa un comportamiento higroscópico pronunciado, ya que el micelio aéreo se vuelve húmedo y muestra manchas negras, 15 lustrosas. Con la ayuda del sistema de clasificación de Waksman (Waksman, The Actinomycetes, Vol. 2, 328-334, 1961) fue posible identificar la cepa NRRL 5678 como *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen, 1931) Waksman y Henrici, 1948.

20 Las propiedades de desarrollo de la cepa NRRL 5678 sobre los medios biológicos normales y su asimilación de carbono están indicadas en las Tablas siguientes.

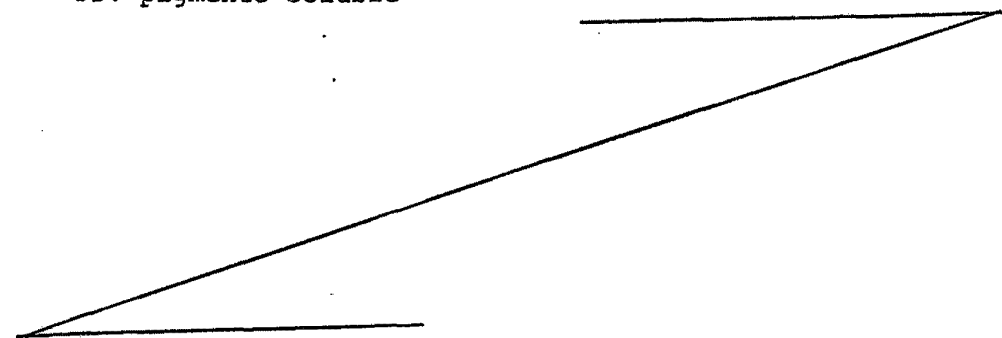


Propiedades de desarrollo

Medio	Propiedades de desarrollo	Forma de micelio
agar con extracto de malta/levadura	D: bueno, color crema a pardo claro LI: amarillo a pardo MA: blanco a gris claro (Gy g) <sup>†</sup> PS: ninguno	espirales compactas 2 - 5 vueltas Spira a
agar con avena	D: bueno, incoloro LI: color crema a amarillo o verde amarillo MA: blanco a gris con algo de micelio amarillo (Gy d) PS: ninguno	espirales compactas 2 - 5 vueltas Spira a
agar con almidón y sales inorgánicas	D: bueno, incoloro LI: color crema a amarillo verde MA: blanco a gris ceniza (Gy d) PS: ninguno	espirales compactas 2 - 5 vueltas Spira a
agar con glicerina y asparagina	D: medio, incoloro a gris claro LI: amarillo a pardo claro MA: blanco a gris claro con algo de micelio amarillo (Gy e) PS: pigmento amarillo claro	espirales compactas 2 - 5 vueltas Spira a

D: desarrollo  
LI: lado inferior  
MA: micelio aereo  
PS: pigmento soluble

<sup>†</sup>) referencia relacionada con el sistema de ruedas de color (colour-wheels)



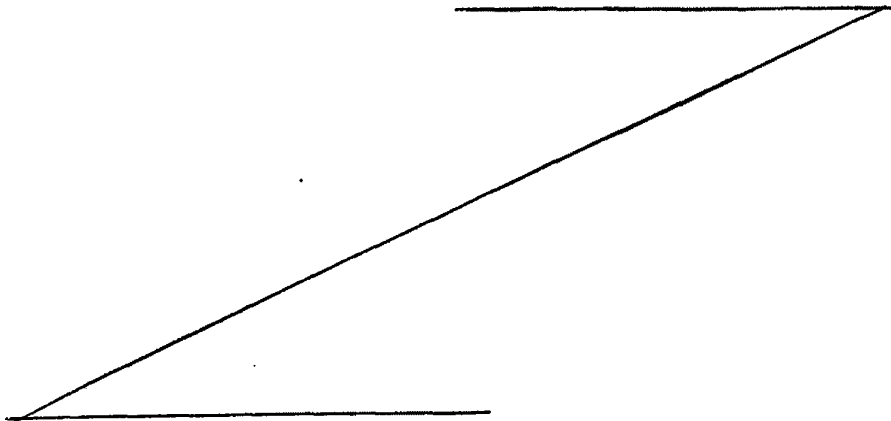
Asimilación de compuestos de carbono

Desarrollo	Fuente de carbono
++	glucosa, sacarosa, fructosa, ramnosa
+-	arabinosa, xilosa, manita, rafinosa
-	inosita, celulosa

- ++ buena utilización
- +- utilización dudosa
- sin utilización

La nueva cepa NRRL 5678 posee las propiedades fisiológicas siguientes:

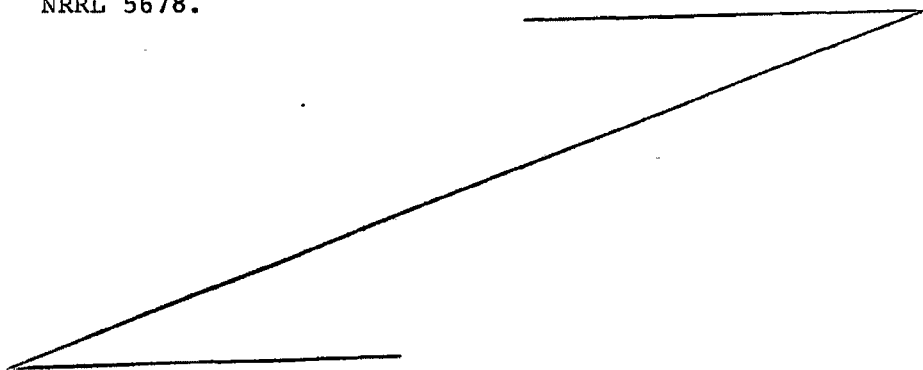
reducción de nitratos	negativa
hidrólisis de almidón	positiva
descomposición de celulosa	negativa
reacción de tirosina	ligeramente positiva
coagulación de leche	negativa
formación de lactopeptona	fuertemente positiva
licuefacción de gelatina	positiva, sin pigmento soluble
formación de melanina	negativa



El cultivo de la cepa NRRL 5678 se efectúa usando métodos conocidos y consiste principalmente en cultivar dicha cepa sobre un medio adecuado y bajo condiciones adecuadas, y separar a continuación el metabolito septamicina, formado durante el cultivo, en forma libre o en forma de una sal del mismo. El cultivo de la cepa NRRL 5678 puede efectuarse de acuerdo con técnicas de cultivo aeróbico de superficie o de cultivo por inmersión.

Al comienzo del cultivo el valor pH del medio de fermentación deberá ser entre 6,8 y 7,0. La temperatura óptima para el cultivo es entre 25 y 35°C. La aeración del cultivo puede variar dentro de límites muy amplios. El rendimiento máximo del metabolito septamicina se obtiene después de un cultivo de 2 a 7 días, dependiendo este tiempo de cultivo, principalmente del medio usado.

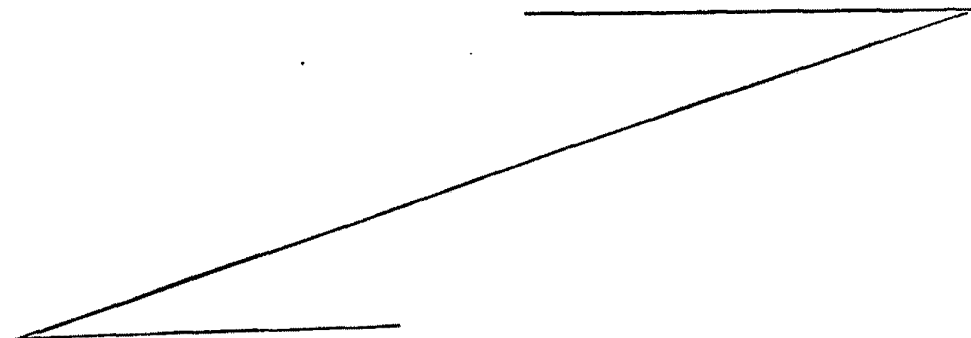
Con el fin de evitar una demora en la producción de septamicina, se prefiere usar la forma vegetativa en lugar de la forma de esporos del microorganismo para la inoculación del medio de producción. Por lo tanto, se prepara primero un inóculo vegetativo del microorganismo, inoculando una pequeña cantidad de un medio de cultivo con una suspensión de esporos de la cepa NRRL 5678.



El medio de fermentación deberá contener principalmente una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable y facultativamente sales minerales y factores de desarrollo, pudiéndose  
5 añadir todos estos elementos en forma de productos bien definidos o de mezclas complejas, tal como se hallan presentes en productos biológicos de orígenes diversos. Especialmente adecuados son los medios a base de glucosa. Pueden usarse alternativamente como fuentes de carbono:  
10 sacarosa, fructosa y ramnosa, y como fuentes de nitrógeno: compuestos orgánicos e inorgánicos conteniendo nitrógeno, tales como peptona, extractos de levadura o carne, nitrato de amonio, sulfato de amonio y aminoácidos.

El medio de cultivo también deberá contener  
15 oligoelementos, los que son esenciales para un desarrollo óptimo del organismo usado para la producción de septamicina. Tales oligoelementos generalmente se hallan presentes como impurezas en los otros componentes del medio en cantidades que satisfacen las necesidades para  
20 el desarrollo de la cepa NRRL 5678, usada de acuerdo con la invención.

Tan pronto como se haya producido la cantidad máxima de metabolito septamicina, el líquido de cultivo se desintegra facultativamente con un aparato Ultraturax  
25 y el metabolito septamicina se aísla en forma conocida

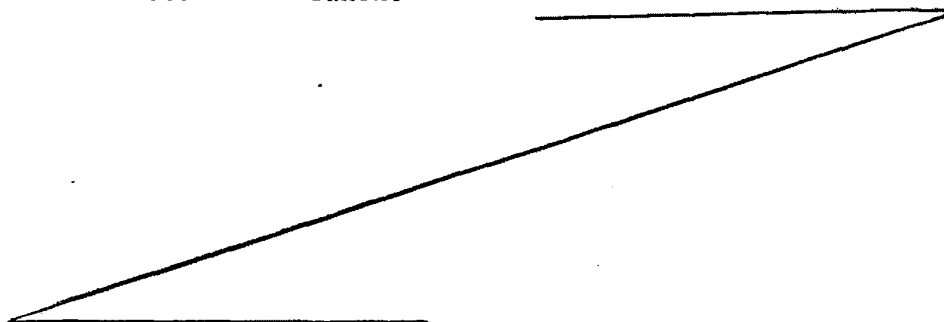


mediante métodos de extracción y/o adsorción. El metabolito septamicina puede a continuación purificarse cromatográficamente, mediante cristalización o distribución a contracorriente.

5                   Un método preferido es la extracción del líquido de cultivo desintegrado con hexano, aunque también pueden usarse otros disolventes orgánicos, p.ej. cloruro de etileno, éter de petróleo, bencina, benceno, cloroformo, acetato de butilo, cloruro de metileno,  
10                   butanol y acetato de etilo.

                  Los extractos se liberan a continuación del disolvente y el metabolito septamicina se purifica cromatográficamente sobre Sephadex LH 20, alúmina, gel de sílice, resinas de adsorción tales como Amberlite  
15                   XAD-2 y XAD-12, silicato de magnesio, óxido de aluminio o similares, mediante distribución a contracorriente y/o cristalización.

                  También es posible lograr un enriquecimiento de septamicina en forma libre o en forma de una sal de  
20                   la misma, mediante cromatografía de adsorción sobre gel de sílice con disolventes no polares (cloroformo y 2-5 % de metanol o cloroformo y 20 % de acetona o con tolueno + 10 % de acetona con la adición de 1 % de tri-etilamina) y subsiguiente filtración con gel Sephadex  
25                   en acetona o metanol.



El uso del metabolito septamicina en forma libre o en forma de una sal de metal alcalino, de metal alcalinotérreo o de amonio del mismo, está indicado en la medicina humana y veterinaria.

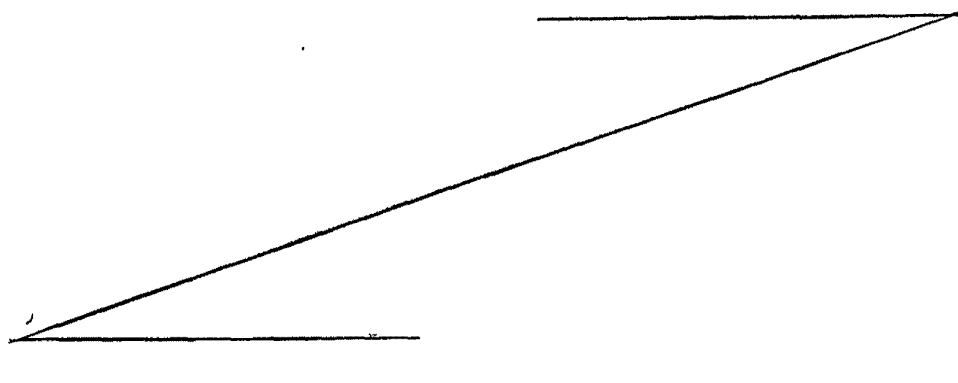
5 El nuevo metabolito septamicina es activo contra las bacterias grampositivas. En el ensayo de dilución se comprobaron las siguientes concentraciones mínimas de inhibición:

	Staphylococcus aureus	0,31 mcg/ml
10	Streptococcus pyogenes	0,1
	Bacillus subtilis	0,1
	Bacillus stearrowthermophilus	0,01
	Neisseria pharyngis	1
	Clostridium pasteurianum	0,1

15 La septamicina en forma libre o en forma de una sal de la misma también exhibe un amplio espectro de efectos antiparasitarios, que comprende los helmintos y los protozoos. Mientras que en el caso de los helmintos medicinalmente importantes el efecto está dirigido especialmente hacia los trematodos tales como S.mansoni y F.hepatica, en el caso de los protozoos la septamicina es especialmente eficaz contra coccidios y plasmodios.

20 Como puede determinarse por el modelo de malaria Plasmodium berghei yoelii en ratones con el método de E.Fink (Z.Tropenmed.Parasit. 23, 35-47, 1972),

25

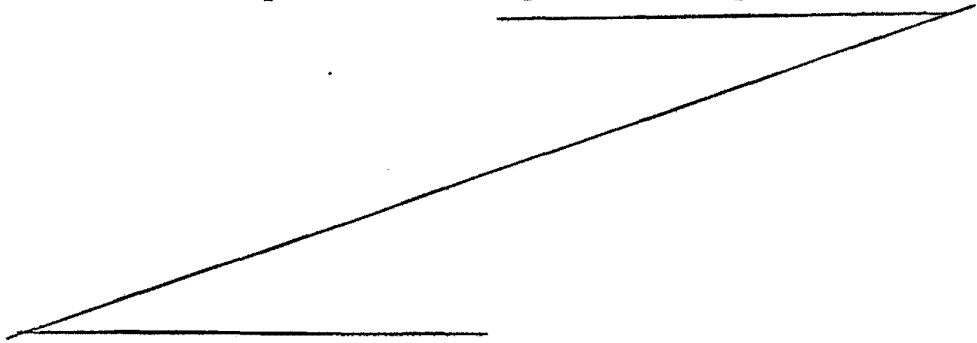


la septamicina es eficaz contra plasmodios, y después de una o varias aplicaciones orales de  $>5$  mg/kg en ratones conduce a una inhibición o interrupción del curso de la infección. El efecto es especialmente pronunciado cuando se empieza la aplicación de septamicina en el día de la infección. Por lo tanto, el uso de la septamicina está indicado en la profilaxis y terapia de diversas formas de malaria en seres humanos.

Una dosis profiláctica presumiblemente es de 30 a 50 mg una vez por semana. Una dosis diaria adecuada para la terapia es de 10 a 20 mg durante 10 días, siendo recomendable una combinación con preparaciones tales como cloroquina, quinina o pirimetamina.

El efecto contra diversos tipos y especies de coccidios queda demostrado bajo condiciones experimentales por el ejemplo *Eimeria tenella*, un parásito protozoario importante que produce coccidiosis en aves de corral, como sigue:

Los ensayos se efectúan con polluelos de un día de edad en un ensayo de 10 días. Los grupos de polluelos se alimentan con un alimento medicinado con septamicina a diversas concentraciones y se infectan oralmente con 200.000 oocistos esporulados de *E.tenella* 48 horas después de comenzar la alimentación al tercer día de vida de los polluelos. Al séptimo día después de la



infección, se detiene el ensayo y se comprueba el efecto tomando en consideración los criterios: mortalidad, grado de lesión del ciego y aumento de peso, comparado con los animales de control infectados sin tratamiento y sanos sin tratamiento.

El ensayo demuestra que la septamicina en el alimento a una concentración de más de 30 ppm detiene o inhibe el curso de la infección con *E. tenella* en el ciego, lo cual, en comparación con los grupos de animales de control, queda indicado por la mortalidad, por el grado de lesión de la membrana mucosa del ciego y por un aumento de peso favorable que queda dentro de los límites de los polluelos sanos.

La septamicina es eficaz contra infecciones de coccidiosis cuando se añade al alimento de los polluelos. Las infecciones se controlan eficazmente con una cantidad de 5 a 50 g de septamicina por tonelada de alimento.

El metabolito septamicina y sales del mismo, mezclados con el alimento, indican que aun a concentraciones bajas mejoran la utilización de los alimentos en rumiantes. Este efecto se comprueba in vitro con una panza artificial. Con este método es posible examinar compuestos en relación con una inhibición de la metanogénesis y/o un cambio en la formación de ácidos grasos

a favor de propionato. Se toma jugo de panza de la panza de un rumiante y se filtra a través de gasa a 39°C mientras se pasa continuamente CO<sub>2</sub>. Este jugo de panza se incuba luego junto con el alimento usado por el animal y conteniendo el compuesto que se va a someter a ensayo. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se toman dos muestras de la cámara de gas y se examinan mediante cromatografía de gas con respecto a metano y dióxido de carbono. La fase líquida se examina luego en relación con su contenido de ácidos grasos. Una comparación con una muestra a la que no se ha añadido agente activo proporciona un parámetro para el efecto. Por ejemplo, la adición de 0,25 ppm de septamicina (calculado sobre el volumen líquido) produce una reducción de aprox. 28 % en la producción de metano. A un grado de fermentación constante, la producción de ácido propiónico aumenta (véase la Tabla).

T a b l a

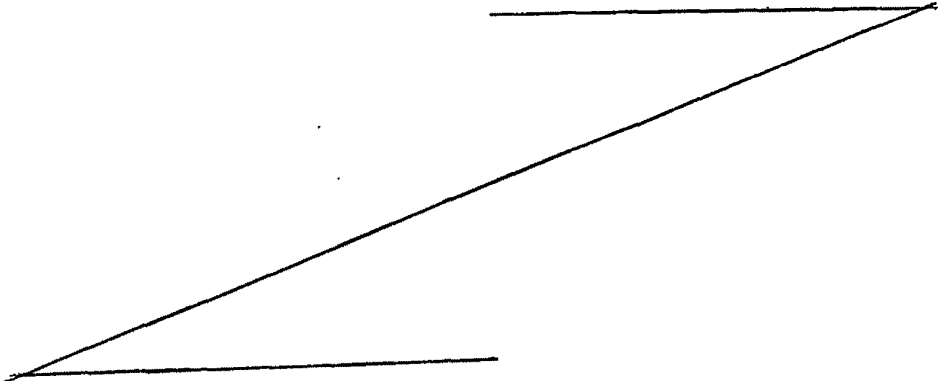
	Control (sin adición de agente activo)	Alimento con 100 ppm de septamicina
Mol % de los ácidos grasos resultantes:		
ácido acético	70,5	67,3
ácido propiónico	17,4	19,9
ácido butírico	12,1	12,8

Por lo tanto, el metabolito septamicina puede usarse en mezcla con los alimentos. El alimento usado preferentemente tiene un contenido de 1 a 500 mg de agente activo por kg de alimento.

5                   La forma más sencilla de aplicar la septamicina, en forma libre o en forma de una sal de metal alcalino, de metal alcalinotérreo o de amonio de la misma, en la medicina veterinaria, consiste en mezclar la misma con el alimento para los animales. Sin embargo,  
10                   la septamicina también puede aplicarse por otras vías. Por ejemplo, puede elaborarse en forma de tabletas, agentes para abrevar, bolos o cápsulas, y puede aplicarse en tales formas. La preparación de septamicina o sales de la misma en tales formas de dosificación  
15                   puede efectuarse de acuerdo con los métodos generalmente conocidos en la farmacia veterinaria.

                  La septamicina o sales de la misma pueden usarse en la medicina humana como medicamentos por sí mismas, ya sea en forma pura cristalina o como concentrado  
20                   bruto, o en forma de preparaciones medicinales apropiadas para aplicación tópica, oral, entérica o parentérica.

                  En el siguiente Ejemplo no limitativo, todas las temperaturas están indicadas en grados Celsius.



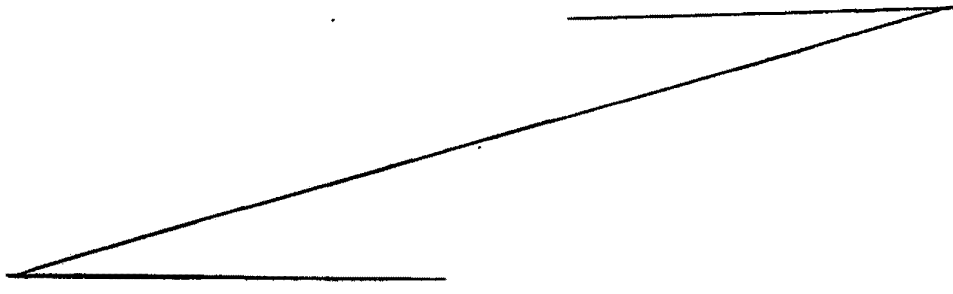
EJEMPLO:

50 cc de una solución nutritiva (de la cual cada litro contiene 30 g de extracto de malta, 5 g de Pharmamedia y agua esterilizada) se inoculan con 2 cc  
5 de un cultivo previo de la cepa NRRL 5678 en un matraz Erlenmeyer de 200 cc. La solución nutritiva se esteriliza previamente en un autoclave a un pH de 6,8 a 7,0 a 121° durante 20 minutos. El matraz Erlenmeyer se sacude durante 4 a 7 días a 27° y a un pH de 6,9 (máquina de  
10 sacudir 200 r.p.m.) con aeración simultánea.

El líquido de cultivo se desintegra a continuación en un aparato Ultraturrax y se extrae con hexano a un pH de 9 (ajustado con solución de sosa cáustica). Después de separar la fase orgánica, ésta se concentra  
15 en vacío y se seca sobre sulfato de sodio. El concentrado se deja fluir lentamente a través de Amberlite XAD-12 y se enjuaga con hexano. La solución resultante se evapora hasta sequedad en vacío a una temperatura máxima del baño de 40° y el residuo se cristaliza de pentano. La  
20 septamicina sodio pura se obtiene cristalizando una vez de hexano.

El metabolito sal sódica de septamicina de fórmula I posee las características siguientes:  
Material cristalino incoloro con un P.F. de 164-166°  
25 (hexano).

Rotación específica:  $[\alpha]_D^{20} = +15,3^\circ$  (c = 0,810 en



cloroformo).

Peso molecular (determinado termoeléctricamente):

937 en cloruro de metileno.

Solubilidad: buena solubilidad en benceno, cloroformo,  
5 acetona, metanol, insoluble en agua.

Análisis elemental:

Hallado: C 61,7 H 8,8 Na 2,4 resto 27,1 %

Calculado: C 61,4 H 8,9 Na 2,4 O 27,3 %

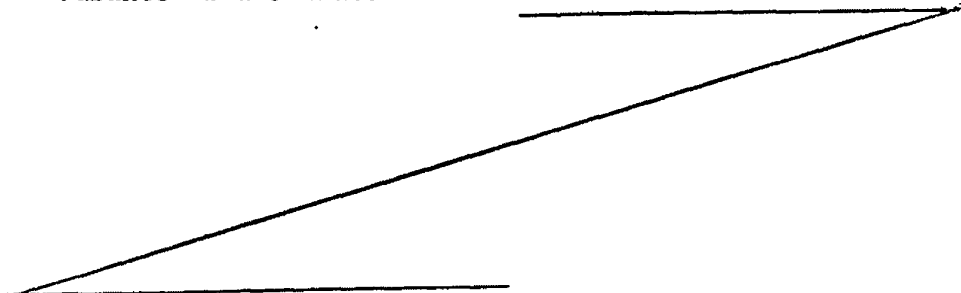
$C_{48}H_{81}O_{16}Na$  (939,16)

10 El cultivo previo usado como material inicial  
se obtiene como sigue:

Un cultivo de agar con buena esporulación de  
la cepa NRRL 5678 se lava con 5 cc de una solución  
estéril de sal común al 0,85 %, con lo cual se obtiene  
15 una suspensión de esporos turbia. Un mililitro de esta  
suspensión de esporos se usa para la inoculación de  
100 cc de un medio de cultivo previo con la composición  
siguiente:

Pharmamedia	25 g/litro
20 glucosa	25 g/litro
y agua destilada hasta 1 litro	

El medio de cultivo previo se esteriliza a un  
pH de 6,7 en un autoclave a 121° durante 20 minutos. Se  
sacuden cantidades de 100 cc del medio de cultivo previo  
25 a 27° (máquina de sacudimiento 200 r.p.m.) con aeración  
durante 2 a 3 días.





5 caracterizado porque se cultiva una cepa de la especie de actinomicetales *Streptomyces hygroscopicus*, preferentemente la cepa NRRL 5678, en contacto con un medio nutritivo hasta que se haya producido una cantidad aislable de septamicina.

2a.- Procedimiento para la producción de septamicina; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado.

10 Esta Memoria consta de 18 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 26 MAR, 1976

SANDOZ, A.G.

J. GOMEZ ACEBO Y ASOCIADOS  
p. p. Firmados L. Gesta Fernández

