



17

F. 8-1-76

Int. Cl. C.12 D

425440

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: KYOWA HAKKO KOGYO CO., Ltd.

RESIDENCIA: Ohtemachi Bldg., Ohtemachi Chiyoda-ku,

TOKYO, Japon.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION

DEL ANTIBIOTICO FORTIMICINA B.

Prioridad: Patente japonesa n. 42696/1973 17-4-73

P.P.

- 2 -
425440

17



1

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

Esta invención se refiere a un nuevo antibiótico, la Fortimicina B y a un procedimiento para su producción. Más específicamente, esta invención se refiere a la producción de Fortimicina B por cultivo de un microorganismo perteneciente al género Micromonospora hasta que se observa actividad antibacteriana en el líquido de cultivo y después aislamiento de la Fortimicina B de dicho líquido.

10

Los antibióticos que presentan actividad contra un amplio espectro de bacterias son siempre muy solicitados. Para este fin, se ha aislado una nueva especie de microorganismo del suelo de un arrozal situado en los suburbios de la ciudad de Hiroshima en la prefectura de Hiroshima, Japón. Esta nueva especie, cuando se cultiva, produce el nuevo antibiótico Fortimicina B que presenta actividad antibacteriana contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Por consiguiente, el nuevo antibiótico puede ser utilizado para varios fines y es especialmente útil como desinfectante de superficies para controlar la población de Staphylococci, Escherichia y otras bacterias.

15

20

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

25

La Figura 1 es el espectro de absorción ultravioleta de la Fortimicina B;

La Figura 2 es el espectro de absorción infrarrojo de la Fortimicina B;

La Figura 3 es el espectro de resonancia magnética nuclear de la Fortimicina B;

30

La Figura 4 es el espectro de resonancia magnética nuclear de la porción de aminociclitol de la Fortimicina B y

La Figura 5 es el espectro de resonancia magnética



425440

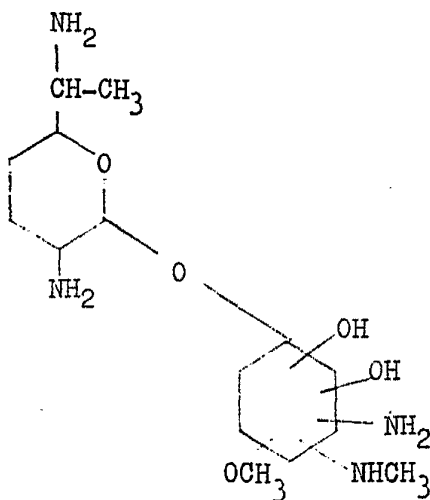
1 nuclear del derivado N-acetilico de la porción de aminocicli-
tol de la Fortimicina B.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 De acuerdo con esta invención, se produce un nuevo
antibiótico, Fortimicina B, por fermentación de un microorga-
nismo perteneciente al género Micromonospora que es capaz de
producir el antibiótico en un medio nutritivo hasta que se de-
10 tecta una actividad antibacteriana considerable en el líquido
de cultivo. Una vez completado el cultivo, el antibiótico se
aisla del líquido por métodos conocidos, por ejemplo por tra-
tamiento con una resina cambiadora de ión.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

15 El nuevo antibiótico de esta invención fué inicial-
mente identificado como XK-70-A y ahora ha sido denominado
Fortimicina B. Se cree que posee la siguiente estructura quí-
mica:



20

25

30 La Fortimicina B se produce por fermentación de un
microorganismo perteneciente al género Micromonospora. Un mi-
croorganismo especialmente adecuado es el Micromonospora

425440

87



1 olivoasterospora que es una nueva especie establecida por es-
tos inventores. Su cepa típica fué originalmente identificada
como cepa MK-70. Esta cepa ha sido depositada en la American
Type Culture Collection, Rockville, Maryland y ha recibido el
5 número de accesoión ATCC 21819. La cepa MK-70 tiene las si-
guientes propiedades:

I. Morfología:

La cepa MK-70 es Gram-positiva. Sobre un medio de
ágar convencional, la cepa MK-70 nunca forma un verdadero mi-
10 celio aéreo como se observa con el Streptomyces, etc. Sobre
la superficie de un medio de ágar donde hay una buena forma-
ción de esporas, se observa una capa de esporas lustrosa,
cerúlea y de color verde oliva. Cuando la cepa se cultiva en
un medio líquido, el caldo de cultivo presenta un leve color
15 trigueño en las etapas iniciales de cultivo, pero en las eta-
pas finales, el caldo de cultivo presenta un color verde oli-
va oscuro y se observa un gran número de esporas en el culti-
vo. Por observación microscópica de las células de la cepa
MK-70 cultivada en un medio líquido, se ha encontrado que el
20 micelio tiene alrededor de 0,5 micras de diámetro, está bien
desarrollado y no es septato. Se forma una sola espora en el
extremo de cada esporoforo (alrededor de 0,3-1,0 micras de
longitud) ramificado del micelio del substrato y las esporas
se forman todas sobre los micelios del substrato relativamen-
25 te largos. Las esporas maduras son esféricas y tienen un diá-
metro de aproximadamente 1,0 micras. Observando las superfi-
cies de las esporas mediante un microscopio electrónico, las
esporas parecen una estrella ya que están constituidas por un
gran número de proyecciones cuyos extremos son algo redondos.
30

425440 17



1 II. Características del cultivo:

El grado de crecimiento, estado de la superficie de la colonia y producción de pigmentos solubles observados cuando se cultiva la cepa MK-70 en diversos medios están indicados en la Tabla I. Las indicaciones de color se dan de acuerdo con la clasificación del Color Harmony Manual (Container Corporation of America). En relación con el medio de tirosina, se utiliza el medio descrito en Gordon y Smith: J:Bact . 69, 147 (1955).

10

TABLA I

<u>Medio</u>	<u>Crecimiento</u>	<u>Color del micelio del subtrato.</u>	<u>Pigmento soluble</u>
Agar de Czapek	Moderado, plano	Oliva pulverulento (1 lg)	Ninguno
15 Agar glucosa-asparagina	Moderado, plano, céreo	Oliva (1 pl)	Ninguno
Agar nutritivo	Bueno, elevado, con rebordes	Oliva (1 pl)	Ninguno
Agar albúmina de huevo	Moderado, plano, céreo	Oliva claro paruzco (1 li)	Ninguno
20 Agar almidón	Bueno, plano	Negro oliva verde de azulado (1 po)	Ninguno
Agar extracto de malta-extracto de levadura	Bueno, elevado, con rebordes	Oliva oscuro (1 pn)	Oliva oscuro (1-1/2 pn)
25 Agar harina de avena	Bueno, plegado, céreo	Bombón escocés ambarino (3 lc) castaños oscuros (2 pn)	Oliva pororiento (1 pg)
Agar dextrosa (1 %)-amina NZ (3 %)	Moderado, plano, céreo	Trigo pálido (2 ea)	Ninguno
Agar de Bennet	Bueno, elevado, con reborde	Oliva oscuro (1 pn)	Ninguno
30 Agar de Emerson	Moderado, elevado, con reborde, céreo	Oliva (1 ni)	Ninguno

425440



1

TABLA I (continuación)

<u>Medio</u>	<u>Crecimiento</u>	<u>Color del micelio del subtrato</u>	<u>Pigmento soluble</u>
Agar glucosa-extracto de levadura	Bueno, elevado, con reborde, céreo	Oliva oscuro (1 pn)	Ninguno
Agar peptona-hierro	Moderado, plano, céreo	Oliva oscuro (1 nl)	Ninguno
Agar tirosina	Moderado, plano, céreo	Oliva (1 ni)	Ninguno

5

III. Propiedades fisiológicas:

10

Las propiedades fisiológicas de la cepa MK-70 se encuentran en la Tabla II. En los ensayos, excepto aquellos sobre la temperatura óptima y las acciones sobre la leche y la celulosa, la cepa se cultiva a 27°C durante 2 semanas. La temperatura óptima se determina al cabo de 5 días de cultivo y las acciones sobre la leche y la celulosa se observan al cabo de 1 mes de cultivo.

15

TABLA II

(1) Utilización de las fuentes de carbono:

<u>Fuentes de carbono</u>	<u>Utilización</u>
D-arabinosa	-
D-galactosa	-
D-glucosa	++
Glicerol	-
D-lactosa	-
D-fructosa	-
L-inositol	-
D-manitol	-
D-rafinosa	-
L-ramnosa	-
Sacarosa	++
Almidón	++

20

25

30



425440

TABLA II (continuación)

1

5

10

15

20

25

30

<u>Fuentes de carbono</u>	<u>Utilización</u>
D-xilosa	-
(2) Licuefacción de la gelatina	Débil
(3) Acción sobre la leche	Peptonizada
(4) Descomposición de la celulosa	Ligeramente positiva
(5) Hidrólisis del almidón	Positiva
(6) pH óptimo para el crecimiento	6,8-7,5
(7) Temperatura óptima para el crecimiento	30°C-38°C
(8) Reducción de nitrato	Positiva
(9) Formación de tirosinasa	Negativa
(10) Formación de pigmentos melanoides	Negativa

La cepa MK-70 es un mesófilo, que nunca forma un verdadero micelio aéreo cuando se cultiva en un medio de ágar, pero forma una espora individual sobre el micelio del substrato y se ha encontrado por análisis que la pared celular de esta cepa contiene ácido mesodiaminopimélico. Por consiguiente, la cepa MK-70 se considera una cepa del género Micromonospora.

No se han establecido bases de confianza para la clasificación sistemática de las especies del género Micromonospora. Por lo tanto, la clasificación de los microorganismos de este género se ha realizado hasta ahora mediante una comparación global de las propiedades morfológicas y fisiológicas, etc. Siguiendo este método de clasificación, se han registrado tres cepas pertenecientes al género Micromonospora, a saber: Micromonospora echinospora subespecie echinospora, NRRL-2985 (ATCC 15837), Micromonospora echinospora subespecie pallida NRRL-2996 (ATCC 15838) y Micromonospora echinos-

425440



1 pora subespecie ferruginea NRRL-2995 (ATCC 15836) que presen-
tan proyecciones redondas sobre la superficie de la espora.
Sin embargo, estas tres variedades de M. echinospora forman
5 esporas de color entre castaño oscuro y negro cuando se cul-
tivan en un medio de ágar convencional pero nunca muestran
un color oliva como la cepa MK-70. Las tres cepas de M. echi-
nospora pueden utilizar L-ramnosa pero la cepa MK-70 no pue-
de. Además, las tres cepas pueden producir dos sustancias
10 activas, una que tiene actividad solamente sobre las bacte-
rias Gram-positivas y un valor Rf de 0,4 a 0,5 en cromatogra-
fía de papel utilizando como desarrollador n-butanol satura-
do de agua y el antibiótico Gentamicina con un valor Rf de
0,00. Por otra parte, la cepa MK-70 puede producir tres cla-
15 ses de sustancias activas, a saber: una sustancia con acti-
vidad solamente sobre las bacterias Gram-positivas y con un
valor Rf de 0,05 a 0,1 en cromatografía de papel utilizando
el desarrollador antes mencionado; una sustancia con activi-
dad solamente sobre las bacterias Gram-positivas y con un Rf
de 0,00 y Fortimicina B, con actividad sobre bacterias Gram-
20 positivas y Gram-negativas y con un valor del Rf de 0,00. Co-
mo resulta evidente de lo que antecede, la cepa MK-70 es di-
ferente de las tres cepas de M. echinospora.

25 La cepa MK-70 presenta un color entre oliva y oliva
oscuro cuando se cultiva utilizando un medio adecuado para la
formación de esporas y produce un pigmento oliva soluble en
otros medios. Entre las cepas del género Micromonospora, hay
algunas capaces de formar esporas de color oliva, a saber la
Micromonospora chalcea, la Micromonospora fusca, etc, pero
éstas se distinguen por el estado superficial de las esporas,
30 el color de los pigmentos solubles, etc.

42544017



1

Otra especie de Micromonospora, a saber la Micromonospora coerulea, habitualmente presenta un color azul verdoso y produce pigmentos solubles de color verde azulado. Los pigmentos funcionan como un indicador de ácido-base y, por lo tanto, son diferentes del pigmento de la cepa MK-70. Además, las esporas de M. coerulea pueden producirse en estado de racimos y las superficies de las esporas son lisas. Por lo tanto, la M. coerulea se distingue de la cepa MK-70.

5

10

Como ya se ha descrito, no hay ninguna cepa que corresponda a la MK-70 entre las cepas del género Micromonospora hasta ahora registradas. Por lo tanto, la cepa MK-70 se considera una nueva cepa perteneciente al género Micromonospora y ha sido denominada Micromonospora olivoasterospora. El nombre de esta especie procede de la formación de esporas esféricas de color oliva con proyecciones. Como ya se ha dicho, la cepa MK-70 ha sido depositada en la American Type Culture Collection como Micromonospora sp. MK-70. La cepa MK-70 también ha sido depositada en el Fermentation Research Institute, Tokyo, Japón, y se le ha atribuido el número de registro FERMP n° 1560.

15

20

25

30

También se han aislado dos cepas variantes de Micromonospora olivoasterospora que tienen la capacidad de producir Fortimicina B. Estas variantes difieren de la cepa tipo en que son capaces de utilizar D-galactosa, D-fructosa y D-xilosa. Las variantes presentan adicionalmente un color trigo claro cuando se cultivan en diversos medios ya que carecen de la capacidad de formar esporas sobre el micelio. En otros aspectos, las variantes se parecen mucho a la cepa tipo. Estas dos variantes también han sido depositadas en la American Type Culture Collection y han recibido los números

425440

187



1 de accesoión ATCC 31009 y ATCC 31010. Estas variantes, así como la cepa tipo, se encuentran a disposición del público.

5 Como en el caso de otras cepas de actinomicetes, los microorganismos útiles para poner en práctica esta invención pueden experimentar mutaciones por medios artificiales tales como irradiación ultravioleta, irradiación con Co^{60} , irradiación con rayos X y diversos productos químicos inductores de mutaciones. Por consiguiente, cualquier cepa, incluso aunque haya sido mutada, es apropiada para esta invención
10 siempre que tenga la capacidad de producir Fortimicina B.

15 Generalmente pueden emplearse los métodos convencionales de cultivo de los microorganismos del género actinomicetes en el procedimiento de esta invención. Así, pueden emplearse diversas fuentes de nutrientes para el medio de cultivo. Las fuentes de carbono apropiadas son la glucoza, almidón, manosa, fructosa, sacarosa, melazas, etc, ya sean solas o en combinación. Además, pueden utilizarse hidrocarburos, alcoholes, ácidos orgánicos, etc, según la capacidad de utilización
20 poseída por el microorganismo particular. Las fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas, como cloruro amónico, sulfato amónico, urea, nitrato amónico, nitrato sódico, etc y las fuentes naturales de nitrógeno como peptona, extracto de carne, extracto de levadura, levadura seca, licor de infusión de maíz, casaminoácido, proteínas vegetales solubles, etc,
25 pueden ser utilizadas solas o en combinación. Además, pueden agregarse al medio, si es necesario, sales inorgánicas como cloruro sódico, cloruro potásico, carbonato cálcico, fosfatos, etc. Además, pueden agregarse adecuadamente al medio materiales orgánicos o inorgánicos capaces de provocar el crecimiento del microorganismo y la producción de Fortimicina B.
30

425440



1 Para este procedimiento el más adecuado es un método
de cultivo líquido, especialmente un método de cultivo sumer-
gido y agitado. Es deseable realizar el cultivo a una tempe-
ratura de 25 a 40°C y a un pH aproximadamente neutro. El anti-
5 biótico de esta invención se forma y acumula en el líquido de
cultivo habitualmente al cabo de 4 a 15 días de cultivo. Cuan-
do el rendimiento de Fortimicina B en el líquido de cultivo
alcanza un valor máximo, se interrumpe el cultivo y el antibió-
tico se aísla y purifica del líquido obtenido después de haber
10 separado las células microbianas, por ejemplo por filtración.

 El aislamiento y la purificación de la Fortimicina
B del filtrado se lleva a cabo por los métodos habitualmente
empleados en el aislamiento y purificación de productos meta-
bólicos microbianos procedentes del líquido de cultivo.

15 Como la Fortimicina B es básica y es soluble en agua
pero poco soluble en los disolventes orgánicos habituales, el
antibiótico puede ser purificado por los métodos habitualmen-
te empleados para la purificación de los llamados antibióticos
básicos solubles en agua. Más específicamente, la Fortimicina
20 B puede ser purificada mediante una combinación apropiada de
adsorción y desorción de resinas cambiadoras de catión; cromatografía
en columna empleando celulosa; adsorción y desorción
de Sephadex LH-20 (nombre comercial, producido por Pharmacia
Fine Chemicals Inc., U.S.A.); cromatografía en gel de sílice
25 y métodos similares.

 Por ejemplo, el filtrado de cultivo exento de células
se ajusta primero a un pH de 7,5 y después se somete a adsor-
ción sobre una resina cambiadora de catión, Amberlite (nombre
comercial, producido por Rohm and Haas Co., U.S.A.) IRC-50
30 (forma NH_4^+). Después de lavar con agua, la elución se reali-

425440

17 ABR



1 za con amoniaco acuoso 1N. La fracción activa se concentra a
presión reducida y después se pasa a través de una columna
de resina cambiadora de anión, como la Dowex (nombre comer-
cial, producido por Dow Chemical Co., U.S.A.) 1x2 (forma OH⁻).
5 Las sustancias adsorbidas se eluyen con agua y las fracciones
activas eluidas se recogen y concentran a presión reducida,
con lo que se obtiene un polvo crudo que contiene Fortimicina
B y otros componentes activos.

10 Se utiliza la cromatografía en gel de sílice, por
ejemplo, como método de aislamiento de la Fortimicina B del
polvo crudo. Como desarrollador, se utiliza la capa inferior
de una mezcla de cloroformo, isopropanol y amoniaco acuoso al
17 % (2:1:1). Más específicamente, el polvo crudo se disuelve
en el disolvente desarrollador, se introduce en una columna
15 de gel de sílice y se desarrolla con el mismo disolvente. La
primera fracción activa contiene Fortimicina B. En las frac-
ciones eluidas sucesivamente, se encuentran otros componentes
activos tales como una sustancia tentativamente identificada
como XK-70-1. Las fracciones que contienen Fortimicina B se
20 recogen y concentran a presión reducida. Después de liofilizar
el concentrado, se obtiene un polvo blanco que comprende la
base del antibiótico.

25 Las fracciones activas conteniendo Fortimicina B son
determinadas por cromatografía de papel ascendente utilizando
papel de filtro Whatman n° 1. El revelado se realiza a la tem-
peratura ambiente durante 10 a 15 horas empleando la capa in-
ferior de una mezcla disolvente de cloroformo, metanol y amo-
niaco acuoso al 17 % (2:1:1). El valor R_f de la Fortimicina B
30 en el cromatograma de papel es alrededor de 0,65.

La Fortimicina B es un polvo básico blanco con un pe-



425440

1 so molecular de 348 y un punto de fusión de 101-103°C. Los
valores analíticos elementales resultan ser: C = 51,72 %, H = 9,20 %, N = 16,16 % y O = 22,92 %. La fórmula molecular se considera que es C₁₅H₃₂N₄O₅.

5 La Figura 1 ilustra el espectro de absorción ultravioleta de una solución acuosa de Fortimicina B. El espectro no revela ninguna absorción ultravioleta máxima característica entre 220 y 360 mμ y presenta simplemente una absorción terminal.

10 La rotación óptica de la base libre de Fortimicina B es $[\alpha]_D^{24} = +22,2$ (c = 1,01, H₂O).

15 La Figura 2 ilustra el espectro de absorción infrarrojo del antibiótico (pastilla de KBr). Como resulta evidente en la figura, la Fortimicina B presenta picos a las siguientes longitudes de onda (cm⁻¹): 523, 561, 650, 702, 755, 815, 879, 917, 993, 1034, 1066, 1093, 1150, 1250, 1336, 1370, 1470, 1578, 2100, 2930 y 3355.

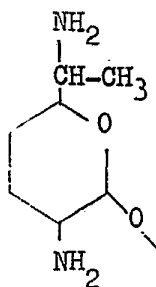
20 El espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de la Fortimicina B está ilustrado en la Figura 3. Como se observa en el espectro, la absorción a 5,62 ppm basada en un protón anomérico sugiere la presencia de un monoglicosido en el antibiótico. El espectro ilustra además un doblete metílico a 1,59 ppm, un pico de metileno a 2,0-2,5 ppm y una absorción a 3,3 ppm adyacente a un protón anomérico. Cuando
25 la Fortimicina B se hidroliza con HCl 6N y se somete a cromatografía en capa fina, se observa una mancha en la misma posición donde la purpurosamíina B forma una mancha por cromatografía en capa fina del hidrolizado de otro antibiótico, a saber la Gentamicina C₂. Por lo tanto, teniendo en cuenta
30 lo que antecede y el espectro de masas que se describe más



425 440¹⁸⁷

1 adelante, se cree que el monoglicosido de la Fortimicina B
es la purpurosamina B representada a continuación:

5



10

La Figura 4 ilustra el espectro RMN de una porción
de aminociclitol obtenida por hidrólisis de Fortimicina B.
Como es evidente en la figura, el espectro presenta un sin-
glete a 3,17 ppm y 3,95 ppm, que indican la presencia de un
grupo N-metilo y de un grupo O-metilo, respectivamente.

15

La Figura 5 ilustra el espectro RMN del derivado
N-acetílico de la porción de aminociclitol. El pico único a
2,48 ppm indica la presencia de un grupo N-acetilo, es de-
cir, la presencia de nitrógeno en la porción de aminociclitol.

20

Los resultados de la espectrometría de masas de la
Fortimicina B son los siguientes: m/e 349,2442, 331,2099,
286,1762, 235,1297, 207,1338, 143,1184, 126,0916, 100,0768,
97,0890, 88,0752, 87,0669, 86,0596, 82,0642, 72,0440, 70,0646,
56,0497, 44,0499.

25

En relación con los datos anteriores de la espectro-
metría de masas, se cree que los valores son indicativos del
estado M^{+1} . Es decir, la carga positiva inducida en la molé-
cula es el resultado de la adición de un núcleo de hidrógeno
más que de la pérdida más común de un electrón. Por lo tanto,
cada valor es superior en un factor de 1 al valor verdadero.
A partir de estos datos, es evidente que el valor del ión mo-
lecular M^{+1} es m/e 349 y el del $M^{+1}-H_2O$ es m/e 331. Adicio-

30

425440

187



1 nalmente, el valor m/e 143 indica la presencia de purpurosamina B.

5 El derivado N-acético de la porción de aminociclitol obtenida por hidrólisis de Fortimicina B tiene un ión molecular M^{+1} de m/e 249 y también $M^{+1} - H_2O$ de m/e 231, $M^{+1} - 2H_2O$ de m/e 213 y $M^{+1} - CH_3OH$ de m/e 217. Por consiguiente, se determina así que su fórmula molecular es $C_{10}H_{20}N_2O_5$.

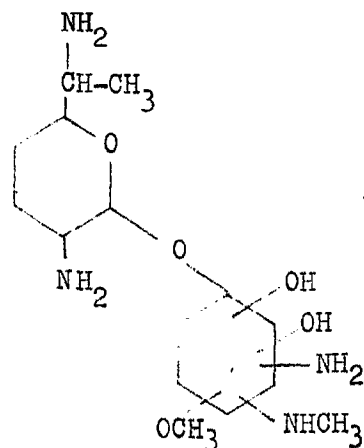
10 De los datos del espectro RMN y del espectro de masas de la porción de aminociclitol, se deduce que la molécula de Fortimicina B contiene un grupo O-metilo, un grupo N-metilo y grupos 2-OH. Este análisis es corroborado por el hallazgo de que cuando la Fortimicina B se oxida con ácido peryódico, se consumen 2 moles de ácido peryódico por mol de Fortimicina. Adicionalmente, cuando el antibiótico es acetilado
15 con anhídrido acético y después tratado con ácido peryódico, el consumo de ácido peryódico por la molécula N-acetilada es nulo.

20 De lo que antecede, se deduce que la Fortimicina B presenta la siguiente fórmula estructural:

20

25

30



425440

17 ABR



1 En relación con la fórmula estructural anterior y
 especialmente con la porción de aminociclitol, los radicales
 están indicados de manera flotante. Aunque la presencia de
 los radicales particulares ha sido confirmada, su situación
 5 todavía no ha sido determinada.

La base libre de Fortimicina B es muy soluble en
 agua, también es soluble en metanol y ligeramente soluble en
 etanol pero es insoluble en disolventes orgánicos como cloro-
 formo, benceno, acetato de etilo, acetato de butilo, éter etí-
 10 lico, éter de petróleo, n-hexano, etc.

Con respecto a los ensayos coloreados, la Fortimici-
 na B da reacciones positivas en el ensayo con ninhidrina y en
 el ensayo con permanganato potásico y reacciones negativas en
 el ensayo de Sakaguchi, en el ensayo de Elson-Morgan y en el
 15 ensayo del biuret.

Los valores Rf de la Fortimicina B obtenidos a par-
 tir de cromatografía de papel y cromatografía en capa fina
 utilizando diversos desarrolladores están indicados en las si-
 guientes Tablas III, IV y V. Estos valores se comparan con los
 20 valores Rf de diversos antibióticos similares desarrollados
 de la misma manera.

TABLA III

Valores Rf de la Fortimicina B en cromatografía de papel as-

25	<u>cedente (a 28°C)</u>		<u>Periodo de desa- rrollo (horas)</u>
	<u>Desarrollador</u>	<u>Valor Rf</u>	
	Cloruro amónico al 20 % (peso/volumen)	0,85	3
	n-Butanol saturado de agua	0,00	15
	n-Butanol - ácido acético- agua (3:1:1)	0,09	15

30

425440



1

TABLA III (continuación)

<u>Desarrollador</u>	<u>Valor Rf</u>	<u>Periodo de desarrollo (horas)</u>
Acetato de etilo saturado de agua	0,00	4
n-Butanol saturado de agua conteniendo 2 % en peso/volumen de ácido p-toluensulfónico y 2 % en volumen/volumen de piperidina	0,07	15

5

TABLA IV

10

Valores Rf de la Fortimicina B y del complejo de Gentamicina C en cromatografía en capa fina de gel de sílice (desarrollado a la temperatura ambiente durante 3 horas)

<u>Desarrollador*</u>	<u>Antibiótico</u>	<u>Valor Rf</u>
I	Fortimicina B	0,80
I	Complejo de Gentamicina C	0,71
II	Fortimicina B	0,62
II	Complejo de Gentamicina C	0,06-0,16

15

*
Desarrollador I: La capa superior de la mezcla de cloroformo, metanol y amoniaco acuoso al 17 % (2:1:1 en volumen)

20

Desarrollador II: Acetato amónico al 10 % y metanol (1:1 en volumen).

TABLA V

25

Valores Rf de antibióticos conocidos en cromatografía de papel ascendente utilizando como desarrollador la capa inferior de la mezcla de cloroformo, metanol y amoniaco acuoso al 17 % (2:1:1) (desarrollado a la temperatura ambiente durante 12 horas)

30

<u>Antibiótico</u>	<u>Valor Rf</u>
Estreptomicina A	0,02

425440



17 ABR 1974

TABLA V (continuación)

	<u>Antibiótico</u>	<u>Valor Rf</u>
1	Estreptomicina B	0,00
	Bluensomicina	0,01
5	Ribostamicina	0,00
	Lividomicina A	0,00
	Lividomicina B	0,03
	Lividomicina D	0,02
	Espectinomicina	0,45
10	Kasugamicina	0,01
	Butirosina A	0,00
	Butirosina B	0,01
	Higromicina B	0,02
	Destomicina A	0,03
15	Gentamicina A	0,00
	Gentamicina B	0,00
	Gentamicina C _{1a}	0,18
	Gentamicina C ₁	0,59
	Gentamicina C ₂	0,38
20	Sisomicina	0,18
	Neomicina A	0,00
	Neomicina B	0,03
	Neomicina C	0,00
	Antibiótico n° 460	0,01
25	Kanamicina A	0,02
	Kanamicina B	0,01
	Kanamicina C	0,02
	Paromomicina	0,00
30	Complejo de Nebramicina	0,01
	Tobramicina	0,02

425440



374

1

TABLA V (continuación)

<u>Antibiótico</u>	<u>Valor Rf</u>
Apramicina	0,02
XK-62-2*	0,49
5 Fortimicina B	0,65

*
Un nuevo antibiótico descrito en la solicitud de patente estadounidense número de serie 364.058 presentada el 25 de Mayo de 1973.

10

Los espectros antibacterianos por el método de dilución en ágar de la Fortimicina B contra diversos microorganismos están indicados en la siguiente Tabla VI.

TABLA VI

<u>Microorganismo ensayado</u>	<u>Concentración mínima de inhibición (γ/ml)</u>
15 <u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 10541	>416,5
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	6,6
<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8942 (resistente a la kanamicina, paromomicina y estreptomomicina)	104,2
20 <u>Staphylococcus aureus</u> KY 8950 (resistente a la estreptomomicina, tetraciclina, penicilina y sulfonamida)	52,1
<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8953 (resistente a la estreptomomicina, kanamicina, paromomicina, tetraciclina, neomicina, kanamicina B y eritromicina)	26,1
25 <u>Staphylococcus aureus</u> KY 8956 (resistente a la estreptomomicina, paromomicina, tetraciclina, eritromicina y oleandomicina)	0,83
<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8957 (resistente al cloranfenicol, estreptomomicina, kanamicina B, tetraciclina y paromomicina)	1,65
<u>Bacillus subtilis</u> n ^o 10707; KY 4273	104,2
<u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	104,2
30 <u>Bacillus cereus</u> var. <u>mycoides</u> ATCC 9463	104,2

425440



TABLA VI (continuación)

	<u>Microorganismo ensayado</u>	<u>Concentración mínima de inhibición (γ/ml)</u>
1	<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	26,1
5	<u>Escherichia coli</u> ATCC 26	13,1
	<u>Escherichia coli</u> KY 8302 (resistente al cloranfenicol, estreptomycin, kanamicina, paromomicina, tetraciclina y espectinomycin)	208,3
10	<u>Escherichia coli</u> KY 8310 (resistente al cloranfenicol, estreptomycin, kanamicina, gentamicina, kanamicina B, paromomicina, tetraciclina y espectinomycin)	52,1
	<u>Escherichia coli</u> KY 8314 (resistente a la estreptomycin)	26,1
	<u>Escherichia coli</u> KY 8315 (resistente a la estreptomycin, kanamicina, paromomicina y neomicina)	26,1
15	<u>Escherichia coli</u> KY 8327 (resistente a la kanamicina, gentamicina, sisomicina y tobramicina)	13,1
	<u>Escherichia coli</u> KY 8331 (resistente a la kanamicina, ribostamicina, neomicina, paromomicina y lividomicina)	1,65
	<u>Escherichia coli</u> KY 8332 (resistente a la kanamicina y tobramicina)	3,3
20	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH nº 1	208,3
	<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	26,1
	<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	52,1
	<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 9992	13,1

25 Resulta evidente de lo anterior que la Fortimicina B ejerce actividad antibacteriana contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y también ejerce actividad antibacteriana contra Staphylococcus aureus y Escherichia coli, que son resistentes a diversos antibióticos conocidos. A la vista de la amplia gama del espectro antibacteriano y de su estructura característica, la Fortimicina B es

30



425440

1 un antibiótico útil como agente antibacteriano superficial.
La Fortimicina B también se considera útil como material de
partida para la síntesis de diversos derivados por modifi-
cación química.

5 Una comparación de la Fortimicina B con otros anti-
bióticos ilustra su novedad. Como antibióticos básicos, solu-
bles en agua, producidos por microorganismos del género Micro-
monospora con un amplio espectro antibacteriano, son conoci-
dos, por ejemplo, la Gentamicina [M.J. Weinstein y colabora-
dores: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1963, 1 y D.J.
10 Cooper y colaboradores: J. Infect. Dis., 119, 342 (1969)];
antibiótico n° 460 (publicación de la patente japonesa número
16153/71); sisomicina [M.J. Weinstein y colaboradores: J. An-
tibiotics, 23, 551, 555, 559 (1970)]; XK-62-2 (solicitud de
15 patente estadounidense número de serie 364058, presentada el
25 de Mayo de 1973). Sin embargo, como es evidente de las Ta-
blas IV y V, los valores Rf de la Fortimicina B en cromatogra-
fía en capa fina de gel de sílice y en cromatografía de papel
se distinguen claramente de los de los componentes A, B, C_{1a},
20 C₂ y C₁ de la gentamicina, de los del antibiótico n° 460, de
los de la sisomicina y de los del XK-62-2. Incluso en la com-
paración de los antibióticos aminoglicosidos básicos solubles
en agua con propiedades similares a las de la Fortimicina B
o sus constituyentes, como la neomicina A (neamina), paromo-
25 micina, gentamicina, etc, estos últimos antibióticos contie-
nen desoxistreptamina como constituyente, mientras que la For-
timicina B no contiene desoxistreptamina y por lo tanto estos
antibióticos son claramente diferentes. Además, la estructura
30 química de la Fortimicina B la distingue claramente de los
otros antibióticos conocidos.

425440



1 Como la Fortimicina B contiene grupos básicos, pue-
de existir en forma de sales de adición de ácido. Por consi-
guiente, esta invención considera las sales de adición no
tóxicas y farmacéuticamente aceptables del antibiótico (es
5 decir, las sales amínicas) incluídas las sales de adición de
ácidos minerales como hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyodu-
ro, sulfato, sulfamato y fosfato y las sales de adición de
ácidos orgánicos como maleato, acetato, citrato, oxalato,
succinato, benzoato, tartrato, fumarato, malato, mandelato,
10 ascorbato y similares.

 La práctica de ciertas realizaciones específicas
de la invención es ilustrada mediante los siguientes ejemplos
representativos:

EJEMPLO 1

15 En este ejemplo, se utiliza Micromonospora
olivoasterospora (ATCC 21819) (FERM-P n° 1560) como cepa de
siembra y se cultiva inicialmente en un primer medio de siem-
bra que contiene 2 % de glucosa, 0,5 % de peptona, 0,5 % de
extracto de levadura y 0,1 % de carbonato cálcico (pH 7,2
20 antes de la esterilización) por inoculación de 4 ml de la
cepa de siembra en 10 ml del medio de siembra en un tubo de
ensayo de 50 ml. El cultivo se realiza a 30°C durante 5 días
con sacudidas. Después se inoculan 10 ml del caldo del culti-
vo de siembra en 30 ml de un segundo medio de siembra en un
25 Erlenmeyer de 250 ml. La composición del segundo medio de
siembra es la misma que la del primer medio. El segundo cul-
tivo de siembra se realiza a 30°C durante 2 días con sacudi-
das.

30 Después se inoculan 30 ml del segundo caldo de
cultivo de siembra en 300 ml de un tercer medio de siembra en



425440 17 AB

1 un Erlenmeyer de 2 litros provisto de tabiques. La composi-
ción del tercer medio de siembra es la misma que la del pri-
mer medio. El tercer cultivo de siembra se realiza a 30°C
5 durante 2 días con sacudidas. Después, se inoculan 1,5 litros
del tercer caldo de cultivo de siembra (correspondiente al
contenido de 5 matraces) en 15 litros de un cuarto medio de
siembra contenidos en un fermentador sacudido de vidrio de
30 litros. La composición del cuarto medio de siembra es la
misma que la del primer medio. El cultivo en el fermentador
10 sacudido se realiza a 30°C durante 2 días con aireación y
agitación (350 rpm; aireación: 15 litros/minuto). Finalmente
se inoculan 15 litros del cuarto caldo de cultivo de siembra
en 150 litros de un medio de fermentación principal en un
15 fermentador de acero inoxidable de 300 litros. El medio de
fermentación principal comprende: 4 % de almidón, 2 % de
harina de soja, 1 % de licor de infusión de maíz, 0,05 % de
 K_2HPO_4 , 0,05 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,03 % de KCl y 0,1 % de $CaCO_3$
(pH 7,5 antes de la esterilización). El cultivo en el fermen-
20 tador se realiza a 30°C durante 4 días con aireación y agi-
tación (150 rpm; aireación: 80 litros/minuto).

El caldo de fermentación resultante se ajusta a
un pH de 2,5 con ácido sulfúrico concentrado y se agita du-
rante 30 minutos. Después se añaden alrededor de 7 kg de un
auxiliar de filtración, Radiolite nº 600 (producto de la
25 Showa Kogaku Kogyo Co., Ltd. Japón) y las células microbia-
nas se separan por filtración. El filtrado se ajusta a pH
7,5 con hidróxido sódico 6N y se pasa a través de una columna
rellena con unos 20 litros de una resina cambiadora de ca-
30 tión, Amberlite IRC-50 (forma amoniaca) y se desprecia el
efluente. Las sustancias activas son adsorbidas en la resina.

425440

187



1 Después de lavar la resina con agua, las sustancias activas
adsorbidas se eluyen con amoniaco acuoso 1N. La actividad del
eluito se determina por el método de disco de papel, utilizan
do una placa de ágar de Bacillus subtilis nº 10707. Se reco-
5 gen las fracciones activas y la mezcla se concentra hasta 1
litro aproximadamente bajo presión reducida. El concentrado
se pasa por una columna rellena con 500 ml de una resina cam-
biadora de anión, Dowex 1x2 (forma OH⁻) y después la columna
se lava con unos 2 litros de agua, con lo que se separan las
10 impurezas. Las sustancias activas se eluyen con agua. Las
fracciones activas así obtenidas se recogen y concentran has-
ta unos 100 ml bajo presión reducida y después se pasan a tra-
vés de una columna rellena con unos 50 ml de carbón activo en
polvo con lo que las sustancias activas son adsorbidas sobre
15 el carbón en polvo. La columna se lava con agua y el efluen-
te y las aguas de lavado se desprecian. Después las sustan-
cias activas adsorbidas se eluyen con ácido sulfúrico 0,2N.
La actividad del eluito se determina por el método del disco
de papel utilizando Bacillus subtilis y se recogen las frac-
20 ciones activas. Las fracciones así obtenidas se pasan por una
columna de Dowex 44 (forma OH⁻). Después las sustancias acti-
vas se eluyen con agua y se recogen y concentran hasta unos
50 ml. El concentrado así obtenido es liofilizado, con lo que
se obtiene un polvo crudo que contiene Fortimicina B. El ren-
25 dimiento de polvo crudo es alrededor de 32 g. El polvo crudo
presenta una actividad de 680 unidades/mg (la actividad de
1 mg de un producto puro corresponde a 1000 unidades).

30 El polvo crudo así obtenido que contiene Fortimici-
na B se coloca uniformemente sobre el extremo superior de una
columna de vidrio apretadamente rellena con alrededor de 1 li-

425440

87



1 tro de gel de sílice. La columna de gel de sílice se prepara
suspendiendo primero el gel de sílice en un disolvente cons-
tituido por cloroformo, isopropanol y amoniaco acuoso al
17 % (2:1:1 en volumen). La suspensión se rellena en la colum-
5 na como capa uniforme y después se lava bien con el mismo di-
solvente. Después de colocar el polvo crudo en la cabeza de
la columna, se realiza la elución con el mismo disolvente que
es gradualmente vertido en la columna desde su parte superior
y, a continuación, se realiza la elución a un caudal de unos
10 50 ml/hora. El eluato se recoge en fracciones de 20 ml cada
una y la actividad de cada fracción se determina por el méto-
do del disco de papel. Las fracciones activas se someten a
cromatografía de papel y las fracciones que contienen Fortimi-
cina B se recogen. La Fortimicina B es el componente activo
15 inicialmente eluido de la columna. Cuando se prosigue la elu-
ción, se eluyen otros subproductos que incluyen la sustancia
activa XK-70-1 antes mencionada, que están contenidos en el
polvo crudo. Las fracciones que contienen Fortimicina B se
recogen y concentran a presión reducida para separar por com-
20 pleteo el disolvente. Después el concentrado se disuelve en
una pequeña cantidad de agua y después de liofilizar la solu-
ción, se obtienen alrededor de 1,5 g de un preparado purifica-
do de Fortimicina B (base libre). La actividad del preparado
es alrededor de 965 unidades/mg.

25

EJEMPLO 2

30

En este ejemplo, se emplea la cepa del Ejemplo 1 como cepa de siembra y se utiliza un medio de siembra que contiene 1 % de glucosa, 1 % de almidón soluble, 0,1 % de extracto de levadura, 0,5 % de peptona y 0,1 % de carbonato cálcico como medio de siembra en 4 etapas del cultivo de siembra. Los

425440

197



1 cuatro cultivos de siembra se realizan de la misma manera que en el Ejemplo 1.

5 A continuación, se inoculan 15 litros del cuarto caldo de cultivo de siembra en 150 litros de un quinto medio de siembra de la misma composición que los medios de siembra anteriores en un fermentador de acero inoxidable de 300 litros. El cultivo en el fermentador se realiza a 30°C durante 2 días con aireación y agitación. Después se inoculan 150 litros del
10 quinto caldo de cultivo de siembra en 1200 litros de un medio de fermentación principal contenido en un tanque de fermentación de 2000 litros. El medio de fermentación principal contiene 4 % de almidón soluble, 3 % de Ebios (nombre comercial, polvo de levadura seco producido por la Tanabe Pharmaceutical Co., Japón), 0,05 % de K_2HPO_4 , 0,05 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
15 0,03 % de KCl y 0,1 % de $CaCO_3$.

La fermentación principal se realiza a 37°C durante 4 días con aireación y agitación. La producción de sustancias activas alcanza casi el máximo después de 96 horas a partir del momento de iniciar el cultivo.

20 Una vez completado el cultivo, la separación y la purificación de la Fortimicina B se realizan de la misma manera que en el Ejemplo 1, con lo que se obtienen unos 34 g de preparado purificado con una actividad de 950 unidades/mg aproximadamente.

25

EJEMPLO 3

En este ejemplo, se utiliza Micromonospora olivoasterospora Mm 744, KY 10067, ATCC 31009 (FERM-P n° 2193) como cepa de siembra. Se emplea como medio de siembra un medio conteniendo 2 % de glucosa, 0,5 % de peptona, 0,3 %
30 de extracto de levadura y 0,1% de carbonato cálcico (pH 7,2

425440



1 antes de la esterilización) para el primero al cuarto cultivo
de siembra realizado de la misma manera que en el Ejemplo 1.

5 Después se inoculan 15 litros del cuarto caldo de
cultivo de siembra en 150 litros de un medio de fermentación
principal en un fermentador de acero inoxidable de 300 li-
tros. El medio de fermentación principal contiene 2 % de almi-
dón soluble, 0,5 % de harina de soja, 2 % de glucosa, 1 % de
licor de infusión de maíz, 1 % de extracto de levadura,
10 0,05 % de K_2HPO_4 , 0,05 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,03 % de KCl y 0,1 %
de $CaCO_3$ (pH 7,0 antes de la esterilización). El cultivo se
realiza a 30°C durante 4 días con aireación y agitación
(150 rpm; aireación: 80 litros/minuto).

15 Una vez completado el cultivo, la separación y
purificación de la Fortimicina B se realizan de la misma ma-
nera que en el Ejemplo 1, con lo que se obtienen alrededor de
1,3 g de preparado purificado con una actividad de unas 962
unidades/mg.

EJEMPLO 4

20 En este ejemplo, se utiliza Micromonospora
olivoasterospora MK-80, KY 11055, ATCC 31010 (FERM-P nº 2192)
como cepa de siembra. Como medio de siembra se emplea un me-
dio conteniendo 1 % de glucosa, 1 % de almidón soluble, 0,5 %
de extracto de levadura, 0,5 % de peptona y 0,1 % de carbona-
to cálcico (pH 7,0 antes de la esterilización) para el prime-
25 ro al quinto cultivo de siembra realizados de la misma mane-
ra que en el Ejemplo 2.

30 Después se inoculan 150 litros del quinto caldo de
cultivo de siembra en 1200 litros de un medio de fermenta-
ción principal contenidos en un fermentador de 2000 litros.
El medio de fermentación principal tiene la misma composición

425440



1 que en el Ejemplo 1. El cultivo principal se realiza a 30°C durante 4 días con aireación y agitación.

5 Una vez completado el cultivo, la separación y purificación de la Fortimicina B se realizan de la misma manera que en el Ejemplo 1, con lo que se obtienen alrededor de 38 g de preparado purificado con una actividad de unas 972 unidades/mg.

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

10

REIVINDICACIONES

15

1. Un procedimiento para la producción del antibiótico Fortimicina B que consiste en cultivar un microorganismo perteneciente al género Micromonospora capaz de producir Fortimicina B en un medio nutritivo y acumular Fortimicina B en dicho medio.

20

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde dicho antibiótico es aislado del citado medio de cultivo.

25

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde dicho microorganismo es un miembro de la especie Micromonospora olivoasterospora.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde dicho microorganismo está seleccionado entre el grupo formado por Micromonospora olivoasterospora ATCC 21819, Micromonospora olivoasterospora ATCC 31009 y Micromonospora olivoasterospora ATCC 31010.

30

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde dicho cultivo se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 25 y 40°C y a un pH aproximadamente neutro.

425440

17 ABR. 1974



1

6. Un procedimiento para la producción del anti-
biótico Fortimicina B que consiste en cultivar un microorga-
nismo seleccionado entre el grupo formado por Micromonospora
olivoasterospora ATCC 21819, Micromonospora olivoasterospora
5 ATCC 31009 y Micromonospora olivoasterospora ATCC 31010, en
un medio nutritivo a una temperatura de 25 a 40°C y a un pH
aproximadamente neutro, acumular la Fortimicina B en dicho
medio y recuperar el antibiótico del mismo.

10

7. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solici-
ta por: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO
FORTIMICINA B.

15

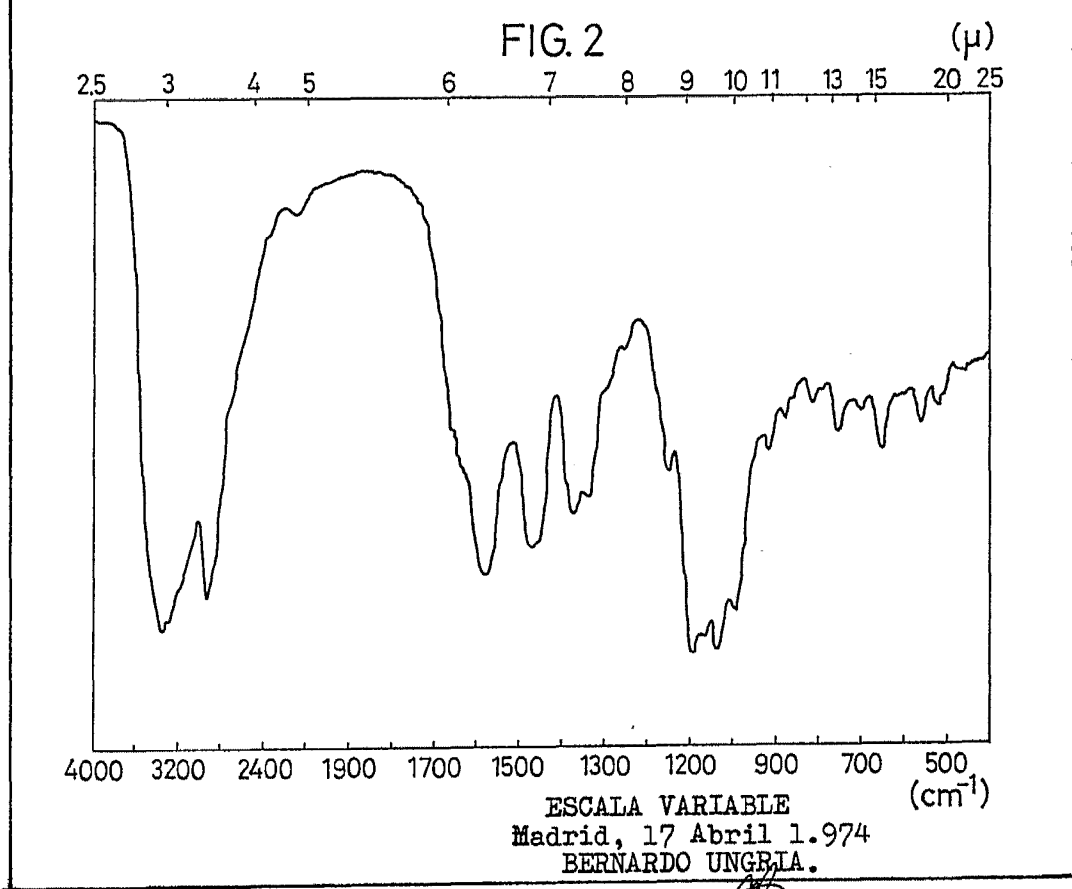
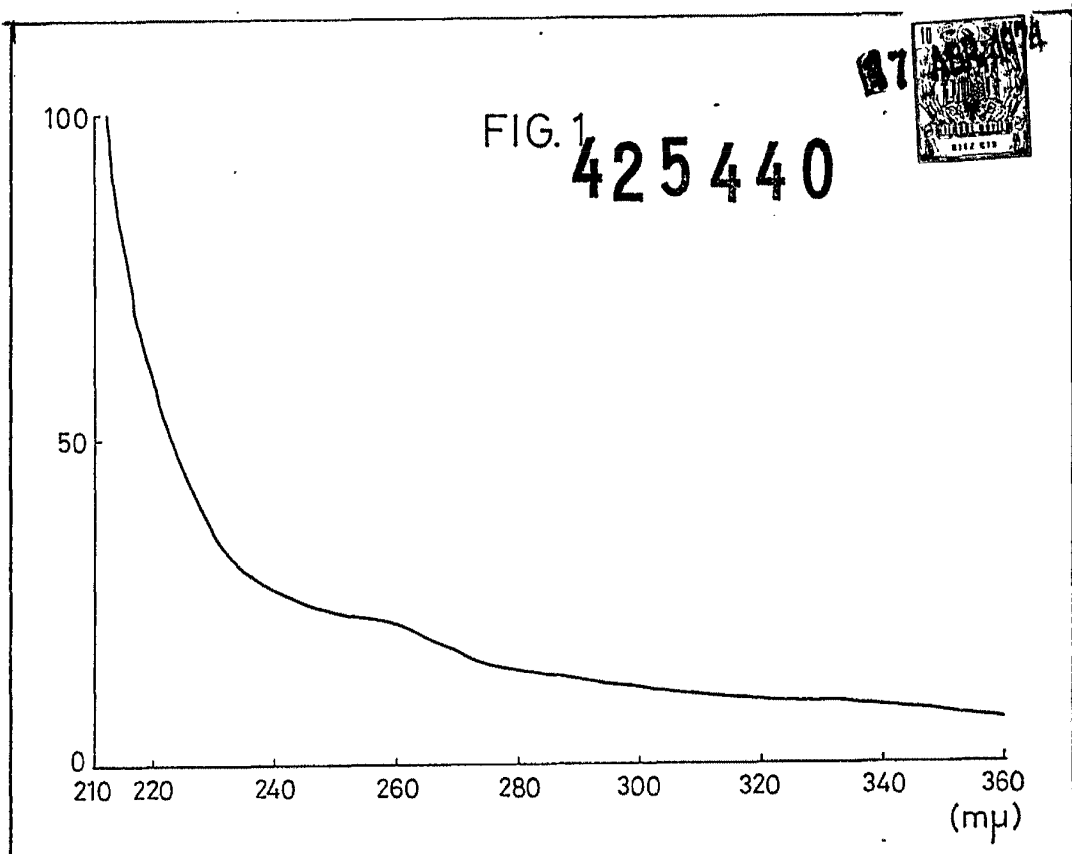
Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente Memoria descriptiva que consta de veintinueve
páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos

Madrid, 17 Abril de 1.974
BERNARDO UNGRIA.

P.P.

20

25



425440



FIG. 3

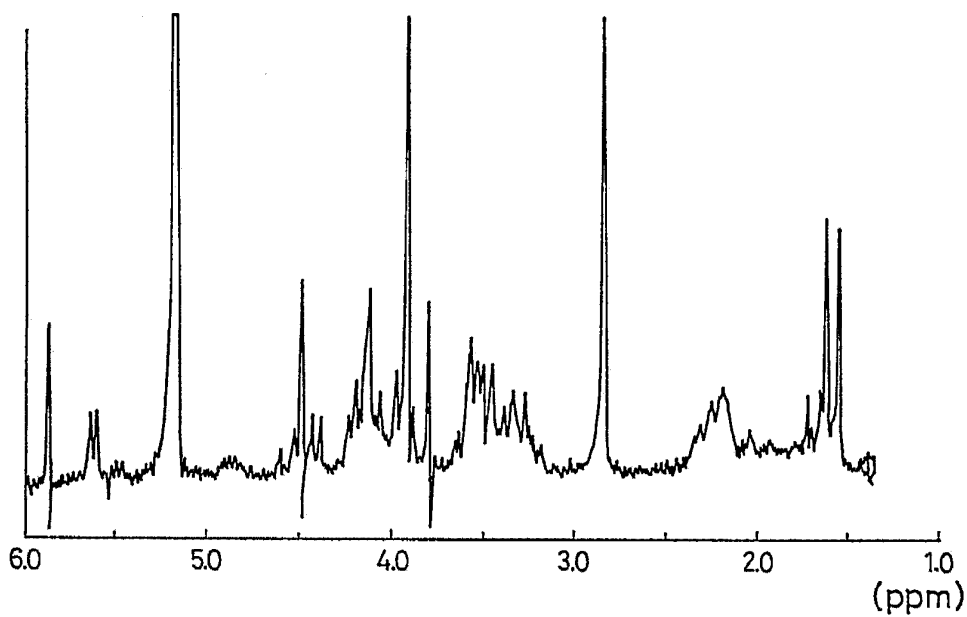
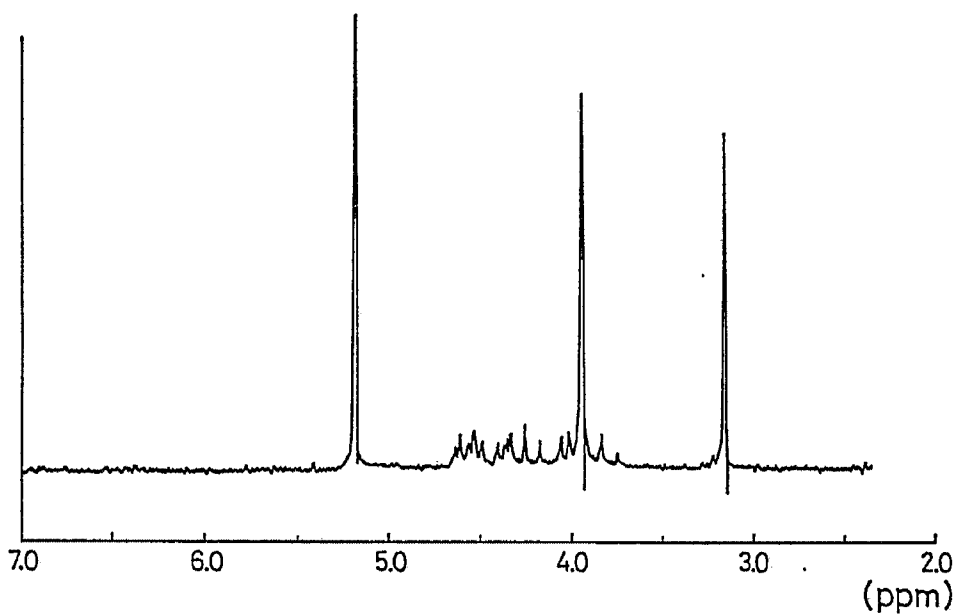


FIG. 4



ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 Abril de 1.974
BERNARDO UNGRIA.

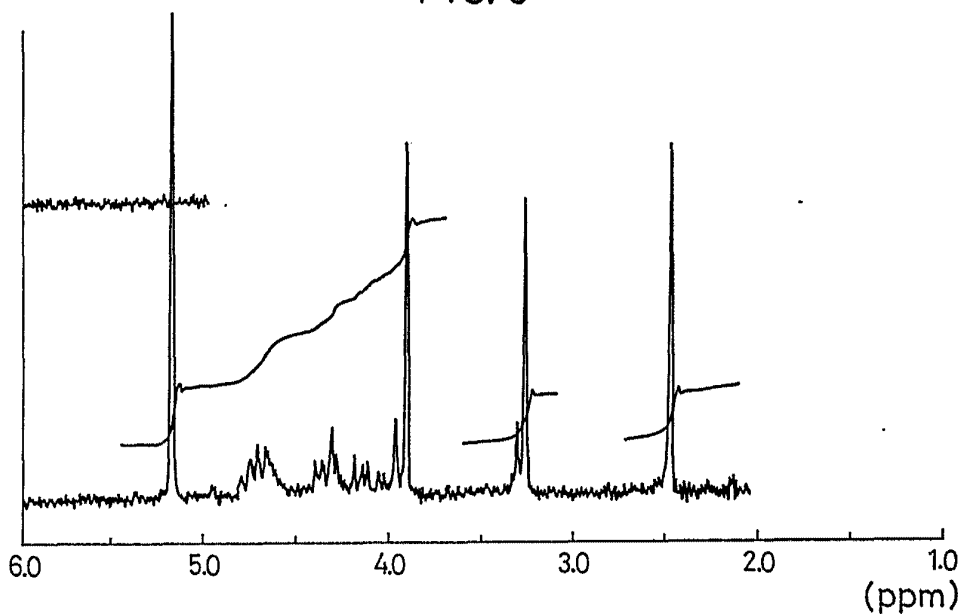
P.P.

425440

87



FIG. 5



ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 Abril de 1.974
BERNARDO UNGRIA.

P.P.