

PATENTE DE INVENCION

Lp. 510.



1974

452101

Cl. C.I.P.	C12D

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE LA SUSTANCIA ANTIBIOTICA
LIPIARMICINA.

=====

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

=====

Esta invención se relaciona con un procedimiento
para preparar una nueva sustancia antibiótica denominada
lipiarmicina. Esta sustancia antibiótica es un compuesto
cristalino, sólido, blanco, que tiene propiedades caracte-
5 rísticas tales como punto de fusión, máximos de absorción



infrarroja y ultravioleta. Igualmente se ha registrado la resonancia magnética protónica.

5 La citada lipiarmicina se puede preparar por el procedimiento de la invención, mediante el cultivo de una cepa que pertenece a una familia de actinoplanaceas. Esta cepa ha sido denominada Actinoplanes deccanensis A/10655 y depositada y constituye parte de la colección de cultivos de ATCC, en donde recibió el número 21983.

10 En la preparación de lipiarmicina, el organismo se cultiva bajo condiciones aeróbicas en un medio nutriente acuoso adecuado para el crecimiento de dicho organismo, conteniendo el medio un agente de carbono, un agente de nitrógeno y sales inorgánicas.

15 Normalmente, la cepa productora del antibiótico se precultiva en un matríz en movimiento, hasta que está presente una actividad sustancial del antibiótico, tras lo cual se utiliza el cultivo para inocular fermentadores que contienen un medio fermentativo nutriente. El cultivo se continúa a 25-35°C bajo condiciones aeróbicas, durante un tiempo suficiente para producir un nivel de antibiótico sustancial. Durante este tiempo se llevan a cabo ensayos microbiológicos por el método de difusión de agar para controlar la concentración de la sustancia antibiótica producida.

25 La lipiarmicina se puede aislar del caldo de fermentación por procesos convencionales, tales como, por ejemplo, por extracción con un disolvente orgánico en el cual es soluble la sustancia antibiótica y que es inmiscible con el medio acuoso.

30 Disolventes orgánicos adecuados son los elegidos, convenientemente, entre hidrocarburos halogenados inferiores,



alcanoles inferiores C₁-C₆ y similares. El disolvente se separa entonces del caldo de fermentación por centrifugación a elevada velocidad, se concentra a un 1/20-1/40 de su volúmen original y se deja reposar hasta que precipita la sustancia antibiótica.

5 La lipiarmicina en bruto se disuelve en una mezcla de cloroformo/metanol 90:10 y se cromatografía a través de una columna de gel de sílice por elución con una mezcla de cloroformo y metanol en las mismas proporciones que antes. La lipiarmicina se cristaliza finalmente en una mezcla de éter dietílico y petróleo ligero.

10 La sustancia antibiótica de la invención es activa contra bacterias, en particular contra los siguientes microorganismos, a las concentraciones indicadas:

CEPA	CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS
	γ/ml.
Staphylococcus aureus ATCC 6538	2
Staphylococcus aureus Tour	2
Streptococcus hemolyticus G203	10
Diplococcus pneumoniae UC 41	50
20 Staphylococcus aureus Tour con 10 % suero bovino	10
Streptococcus mutans ATCC 25175	0,5
Mycobacterium tub. H ₃₇ R _v ATCC 9360	50
Mycoplasma gallisepticum H 21 C.Z.B.	50

25 La lipiarmicina es también activa contra cepas que son resistentes a otros antibióticos que se utilizan ampliamente en la práctica quemoterapéutica actual. Como un ejemplo representativo, se registra en la siguiente tabla las concentraciones inhibitorias mínimas (M.I.C.) de lipiarmicina contra cepas de Staphylococcus aureus resistentes a varios antibióti-
30 cos.



T A B L A II

CEPA	M.I.C. de otros antibió- ticos	M.I.C. de lipiarmi- cina
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a penicilina	penicilina > 100	2
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a estreptomina	estreptomina > 100	5
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a tetraciclina	tetraciclina > 100	5
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a novobiocina	novobiocina > 100	2
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a neomicina	neomicina > 100	2
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a eritromicina	eritromicina > 100	5
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a cloranfenicol	cloranfenicol > 100	2
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a cefaloridina	cefaloridina > 100	5
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a estreptotricina	estreptotricina > 100	5
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a bacitracina	bacitracina > 100	5
Staphylococcus aureus ATCC 6538 resistente a oleandomicina	oleandomicina 50	5

Estas propiedades antimicrobiales favorables vienen acompañadas por una toxicidad muy baja, siendo el valor LD₅₀ de lipiarmicina de unos 500 mg/kg i.p. en los ratones.



Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición terapéutica que comprende el compuesto de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción de Actinoplanes deccanensis A/10655

5 La cepa crece bien en muchos agares. La superficie es opaca y ligeramente áspera hasta rugosa. El micelio aerial está siempre ausente. En el examen microscópico el micelio vegetativo está ramificado con un diámetro aproximado de 1μ .

10 La esporangia se forma abundantemente sobre agar de extracto de suelo y son globulados con superficie irregular y un diámetro que oscila entre 4 y 7 micras. Después de romper la pared del esporangio, es posible observar la liberación de esporas. Las esporas son subesféricas y móviles (tamaño $1\mu \times 1,5\mu$).

15 La Tabla 3 registra las características de cultivo de Actinoplanes deccanensis A/10655, cultivado sobre varios medios standard sugeridos por Shirling y Gottlieb (Intern. J. Syst. Bact., 16, 313-340, 1966) y otros medios recomendados por Waksman (The Actinomycetes, vol. II. The Williams and
20 Wilkins Co., 1961). Las características de cultivo se determinaron después de 6 a 14 días de incubación a 30°C.

TABLA III

El número de algunos de los medios de cultivo se refiere a los suministrados por Shirling and Gottlieb.

25

Medio de cultivo	Características de cultivo
Medio No. 2 (extracto de levadura-agar de malta)	Abundante crecimiento, muy rugoso, naranja claro
Medio No. 3 (agar de harina de avena)	Moderado crecimiento, con costra, ambar claro

30



TABLA III (Continuación)

Medio de cultivo	Características de cultivo
Medio No. 4 (sales inorgánicas-agar de almidón)	Abundante crecimiento, con costra, naranja
Medio No. 5 (glicerol-agar de asparagina)	Moderado crecimiento, superficie rugosa, naranja
5 Medio No. 6 (peptona-extracto de levadura-agar de hierro)	Moderado crecimiento, rugoso, naranja claro
Medio No. 7 (agar de tirosina)	Abundante crecimiento, rugoso, ambar a marrón claro, pigmento marrón difusible
Agar de harina de avena según Waksman	Abundante crecimiento, con costra, opaco, naranja claro
Agar de Hickey y Tresner	Abundante crecimiento, rugoso, naranja claro-rosado
Agar de glucosa de Czapeck	Moderado crecimiento, con costra, crema a naranja claro
10 Agar de glucosa-asparagina	Moderado crecimiento, ligeras costras, opaco, crema a naranja claro.
Agar nutriente	Moderado crecimiento, con costra, opaco, naranja claro.
Agar de patata	Abundante crecimiento, muy rugoso, naranja pálido
Agar de Bennett	Abundante crecimiento, rugoso, naranja claro
Agar de malato de calcio	Escaso crecimiento, rugoso, naranja claro opaco
15 Agar de leche descremada	Abundante crecimiento, rugoso, naranja opaco
Agar de Czapeck	Moderado crecimiento, con costra, naranja claro
Agar de huevo	Escaso crecimiento, delgado, opaco, blanco cera
Agar de peptona-glucosa	Moderado crecimiento, con costra, naranja
Agar	Muy escaso crecimiento, delgado, hialino



TABLA III (Continuación)

Medio de cultivo	Características de cultivo
Agar de Loeffler	Moderado crecimiento, superficie dispersa, naranja
Patata	Moderado crecimiento, rugoso, naranja claro
Gelatina	Escaso crecimiento, naranja claro
Agar de celulosa	Muy escaso crecimiento, delgado, hialino

La temperatura más conveniente para el desarrollo de las colonias resultó ser de 18 a 42°C aproximadamente, siendo la óptima de 28 a 37°C aproximadamente. La Tabla 4 registra la utilización de fuentes de carbono examinadas según el método de Pridham y Gottlieb.

TABLA IV

Fuentes de carbono	Utilización
Inositol	-
Fructosa	-
Ramnosa	+
Manitol	-
Xilosa	+
Rafinosa	-
Arabinosa	+
Celulosa	-
Sucrosa	+
Glucosa	+

5



TABLA IV (Continuación)

Fuentes de carbono	Utilización
Manosa	+
Lactosa	+
Salicina	-

La Tabla 5 registra las características fisiológicas de la cepa.

TABLA V

ENSAYO	RESULTADOS
Hidrólisis de almidón	positiva
Formación de H ₂ S	negativa
Reacción de tirosinasa	positiva
Hydrólisis de caseína	negativa
Solubilización de malato cálcico	positiva
Reducción de nitrato	positiva
Liquefacción de gelatina	positiva
leche tornasol	} coagulación negativa } peptonización negativa
Descomposición de celulosa	negativa
Acción cromogénica	positiva

5

PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO Y AISLAMIENTO DEL MISMO

Para producir la sustancia antibiótica, la cepa *Actinoplanes deccanensis* A/10655 se precultiva aeróticamente en un medio nutriente hasta que está presente una actividad sustancial del antibiótico, a un valor pH comprendido entre 6



y 8 aproximadamente.

Como ejemplo de un cultivo en matr az agitado o en movimiento, se puede dar la siguiente composición en gramos/litro:

5	Extracto de carne	3,0
	Triptona	5,0
	Extracto de levadura	5,0
	Glucosa	1,0
	Almidón soluble	24,0
10	Malato cálcico	4,0
	Agua destilada q.s. hasta	1000 ml.

Los matraces se sacuden durante 24 horas aproximadamente a unos 28-30 C y se utilizan entonces los precultivos (1 litro) para inocular fermentadores en jarra que contienen cada uno 10 litros del siguiente medio nutriente:

15	Extracto de carne	40 g.
	Peptona	40 g.
	Extracto de levadura	10 g.
	Cloruro sódico	25 g.
20	Harina de soja	100 g.
	Glucosa	500 g.
	Carbonato cálcico	50 g.
	Agua corriente q.s. hasta	10 litros

Los lotes de fermentación se incuban aerobicamente bajo agitación a 28-30 C. A intervalos, se ensaya microbiologicamente la actividad del antibiótico por el método de difusión de agar utilizando Staphylococcus aureus como organismo del ensayo. La actividad máxima se alcanza después de 72-96 horas de fermentación.



AISLAMIENTO DE LIPIARMICINA

5 El caldo de fermentación se extracta dos veces con una cantidad de butanol correspondiente a 30 % de su volúmen. El disolvente se separa del medio por centrifugación a elevada
10 velocidad y se concentra a un 1/20 de su volúmen original por evaporación bajo vacío a 40-50°C. La solución butanólica resultante se lava con agua y se separan las dos capas. La porción orgánica se concentra adicionalmente a 1/30 aproximadamente de su cantidad original y se deja reposar durante 3-7 horas a 4°C hasta que se forma un precipitado, que se recupera por filtración. Por adición de petróleo ligero al filtrado, se obtiene compuesto en bruto adicional. A partir de 10 litros de caldo de fermentación se recuperan 11 g de sustancia antibiótica.

15 La lipiarmicina en bruto obtenida se disuelve en una mezcla de cloroformo/metanol 90:10 y a la solución obtenida se añade una cantidad compatible de gel de sílice. La mezcla se evapora hasta sequedad bajo vacío a 40-50°C, se añade el sólido obtenido a la parte superior de una columna de gel de sílice y la ulterior elución se efectúa con una mezcla de
20 cloroformo y metanol en la misma proporción que antes.

La sustancia antibiótica purificada, obtenida, se disuelve en una pequeña cantidad de metanol, se añade entonces la solución resultante con éter dietílico y se calienta a unos
25 40°C durante unos pocos minutos. Se añade petróleo ligero a esta solución caliente hasta que se observa una ligera opacidad, tras lo cual se deja reposar el conjunto a 3-6°C durante 1 día. Precipita lipiarmicina pura que se recupera por filtración y se seca bajo vacío.

30 La lipiarmicina, producida por el método anterior, es



una sustancia cristalina blanda que tiene las siguientes propiedades:

1) Punto de fusión: 173-175°C (en una mezcla de metanol, éter dietílico y petróleo ligero).

5 2) Peso molecular: 1076 (determinación potenciométrica).

3) Análisis elemental

C 58,02 %; H, 6,94 %; Cl 6,64 %; O 28,40 % (por diferencia)

4) Bandas de absorción U.V.:

10 En cada uno de los sistemas disolventes indicados a continuación, la lipiarmicina muestra los siguientes valores:

<u>Disolvente</u>	(Max(m μ))	E ₁ ^{1%} 1 cm.
metanol (1)	232 (hombro) 268 315	354 214 108
Tampón fosfato (3) pH 7,38	238 275	331 194
Acido clorhídrico (2) 0,1 N	231 272	338 207
Hidróxido de sodio (4) 0,1 N	235 270 (hombro)	370 183

20 La representación completa del espectro se ofrece en la figura 1.

5) Espectro infrarrojo

Las bandas de absorción características se presentan en las siguientes frecuencias (cm⁻¹).

25 3600, 3450, 2900(Nujol), 1730, 1690, 1640, 1585, 1560,
1460(Nujol), 1380(Nujol), 1300, 1240, 1200, 1140, 1120,
1075, 1025, 990, 950, 915, 900, 890, 850, 820, 790, 780,
745, 720, 705.

30 En la figura 2 se ofrece una representación completa del espectro I.R.



6) Rotación específica: $[\alpha]_D^{20}$ (1,98 % metanol) = -5,52.

7) Resonancia magnética protónica, espectro R.M.P.: véase figura 3.

8) Solubilidad

5 Muy soluble en etanol, metanol, piridina, carbonato sódico acuoso.

Claramente soluble en benceno, cloruro de metileno, cloroforno, acetona, propanol.

10 Escasamente soluble o insoluble en agua, solución tamponada a pH 7, bicarbonato sódico acuoso, hexano.

9) Reacciones características

Tollens	positiva
FeCl ₃	positiva
H ₂ SO ₄	positiva
Schiff	negativa
Millon	negativa
Maltole	negativa

15

10) Acidez

Una función ionizable es evidenciada espectrofotométricamente con pK_a (en metilcellosolve): 6,8.

20 Sobre la base de los datos microanalíticos, la lipiarmicina puede ser correlacionada con la siguiente fórmula empírica: C₅₂H₇₄Cl₂O₁₉.

N O T A
=====

25 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Inglaterra con el nº 54.170/73 de 22 de noviembre de 1.973, acogién-
30 giéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Conve-



5 nios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la
esencia del referido invento por lo que se solicita Patente de
Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA
OBTENCION DE LA SUSTANCIA ANTIBIOTICA LIPIARMICINA; caracteri-
zándose por lo siguiente:

10 1.- Procedimiento para la obtención de la sustancia
antibiótica lipiarmicina, caracterizado porque comprende culti-
var el microorganismo Actinoplanes deccanensis A/10655, asigna-
do al número 21983 del catálogo ATCC, bajo condiciones aeróbi-
cas, en un medio nutriente acuoso que contiene una fuente asimila-
ble de carbono, una fuente asimilable de nitrógeno y sales
inorgánicas, a una temperatura de 25-35°C, hasta que se produ-
ce una actividad antibiótica sustancial; y recuperar dicha ac-
tividad del medio.

15 2.- Procedimiento para la obtención de la sustancia
antibiótica lipiarmicina, tal y como queda sustancialmente des-
crito en la presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjun-
tos.

20 Esta Memoria consta de 13 hojas escritas a máquina
por una sola cara.

Madrid, 22 NOV. 1974

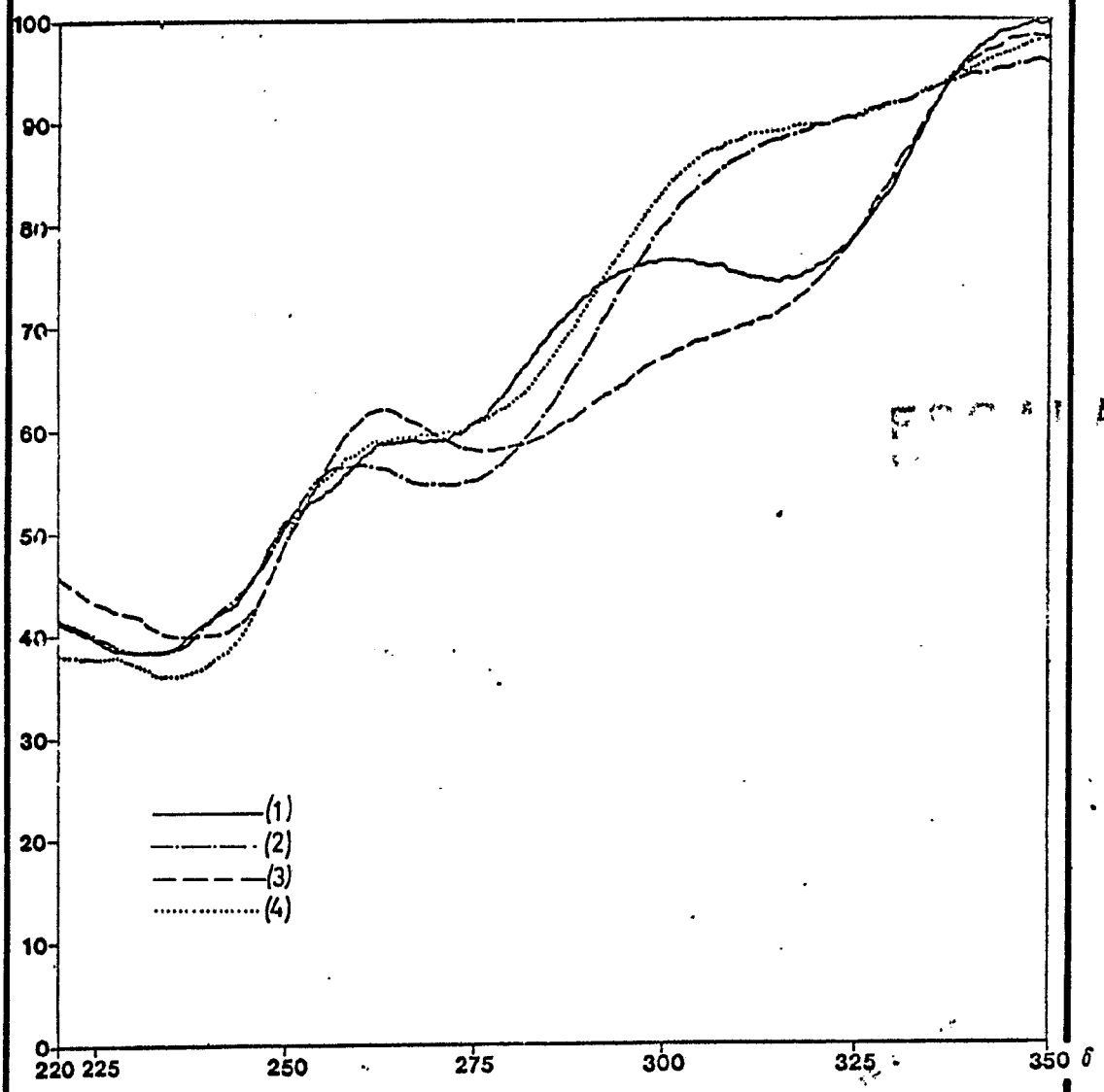
GRUPPO LEPETIT S.p.A.

L. GOMEZ ACEBS Y MUDRY

p. p. Firmados L. Gual Fernández



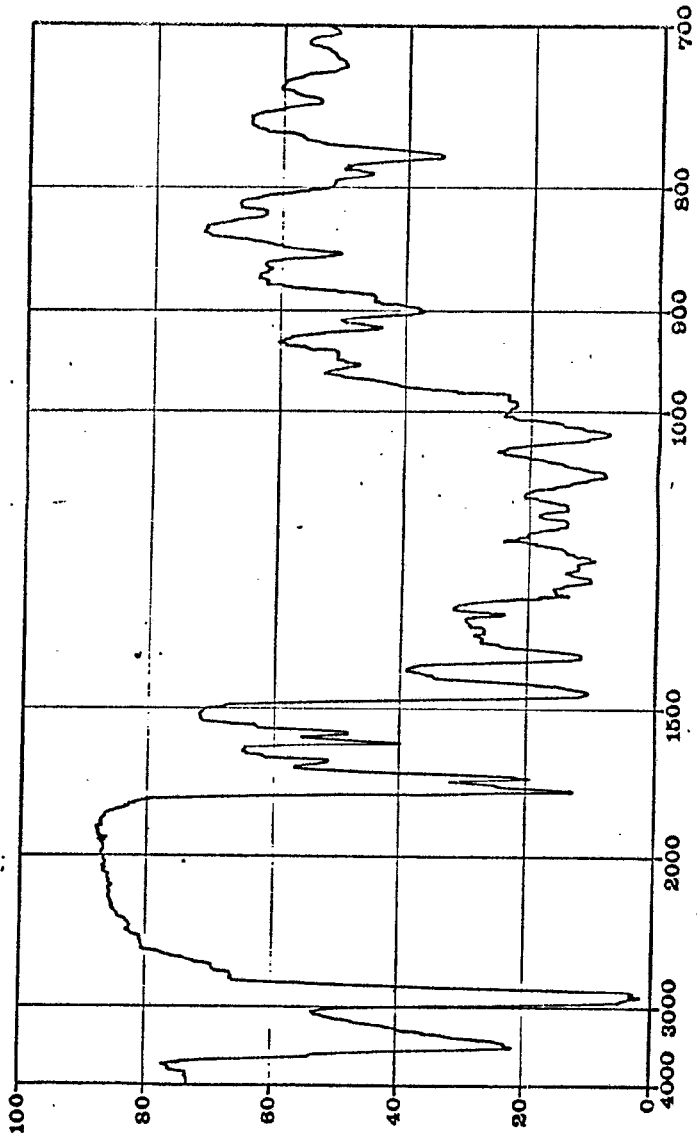
FIG. 1



ESCALA VARIABLE.

Madrid 23 ENF 1974
J. GOMEZ ACEBO Y CAÑADA
F. Firmador: L. Gasia F. Rodríguez

FIG. 2



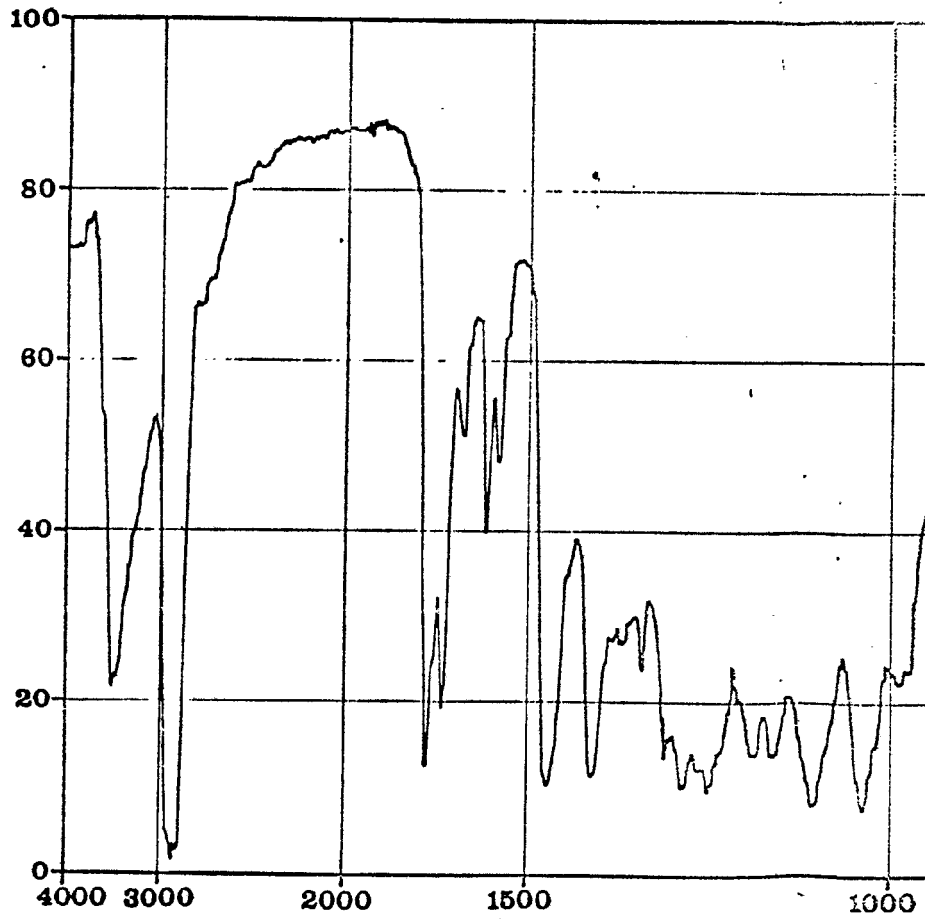
ESCALA
VARIABLE

Madrid

J. BONEZ ACEDO Y RIQUET
Ingenieros de Edificación

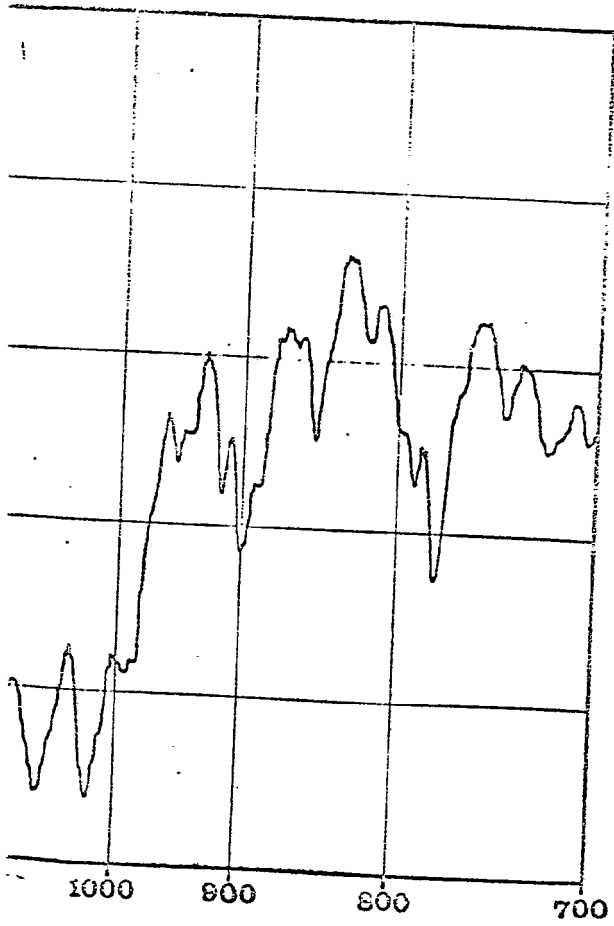
Ingeniero de Edificación

FIG. 2



ESCALA VARIABLE.

2

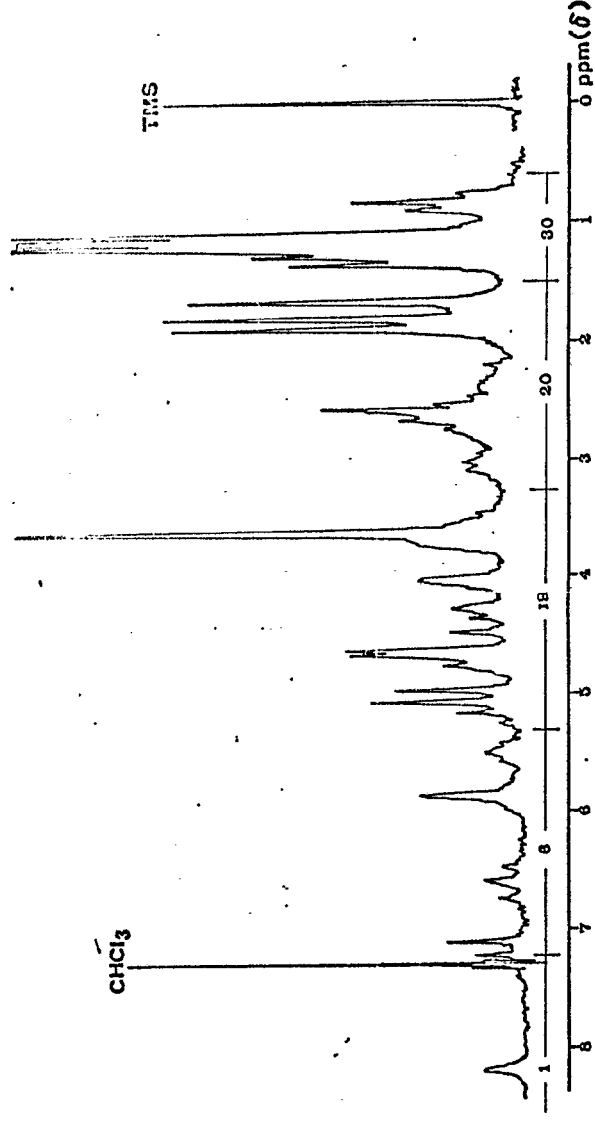


ESCALA
VARIABLE

Madrid

I. BOMEZ ACEDO Y MOJER
p. Firmas: L. Costa Fernández

FIG. 3

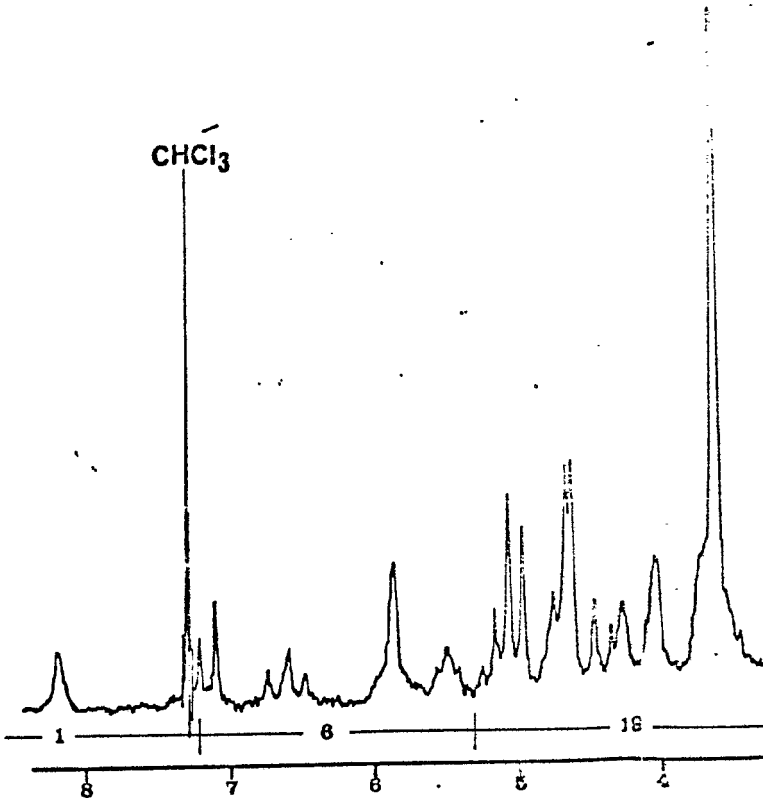


ESCALA
VARIABLE

Madrid 3 EN 1974
X. GONZALEZ FERRER Y RODRIGUEZ
Dr. Filósofo, La Granja, Madrid

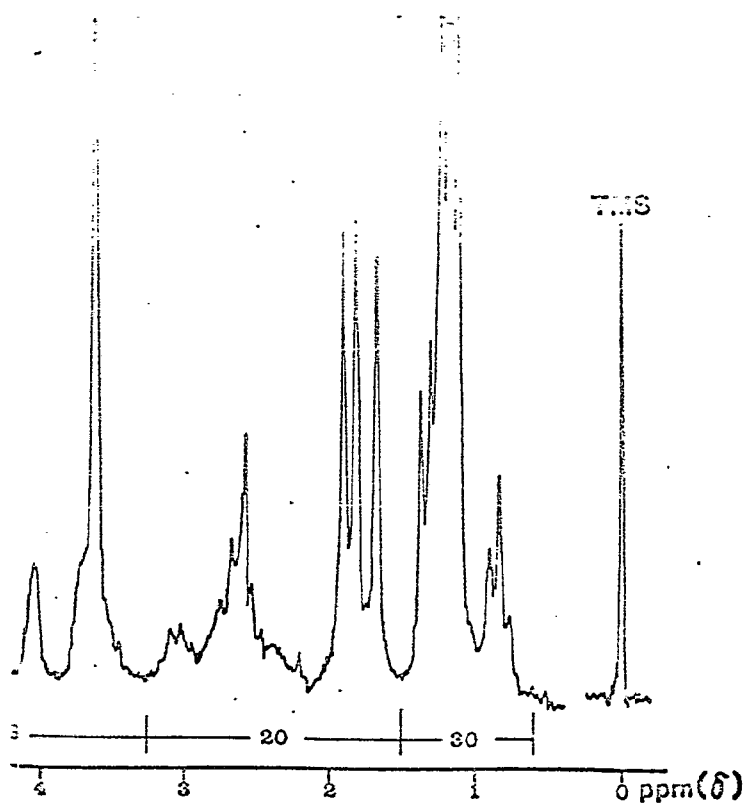
ESCALA VARIABLE.

FIG. 3



ESCALA VARIABLE.

IG. 3



ESCALA
VARIABLE

Madrid, 24 de Mayo de 1978

J. GOMEZ ACEBO Y MOJAT
P. B. Firmador: L. Goñiz Fernández