



ES	(11) NUMERO	A 1
	(21) 433.631	
	(22) FECHA DE PRESENTACION	
	8-1-1975	

P.- 59.385

PATENTE DE INVENCION

232119
Case 5537

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
431.845	9-1-74	E.U.A.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D//A 61K	

(54) TITULO DE LA INVENCION
"UN METODO MEJORADO PARA PRODUCIR UN ANTIBIOTICO DE ANSAMICINA CULTIVANDO UN MICROORGANISMO"

(71) SOLICITANTE (S)
PFIZER INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
235 East 42nd Street, Nueva York, Nueva York, E.U.A.

(72) INVENTOR (ES)
Walter Daniel Celmer, Frank Christian Sciavolino, John Broderick Routien y Walter Patrick Cullen

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ

Esta invención se relaciona con un método mejorado para la producción de antibióticos de ansamicina, particularmente mediante el crecimiento de microorganismos.

5 Las rifamicinas, un grupo de antibióticos estrechamente relacionados, se describen por Sensi y otros: *Farmaco*, Ed. Sci. 14, 146 (1959); *Anuario de Antibióticos 1959/1960*, 262 (1960a); *Experientia* 16, 412 (1960b); *Farmaco*, Ed. Sci. 16, 165 (1961); y *Res. Progr. Org. Biol. Med. Chem.* 1, 337 (1964).

10 La constitución de las rifamicinas se estableció por V. Prelog, *Química Aplicada Pura*, 7, 551 (1963b). Prelog inventó el término "ansamicina" para referirse a esta clase específica de antibióticos de molécula grande.

15 Esta invención está relacionada con una mezcla de ansamicinas que se produce mediante una nueva especie de Micromonospora, designada Micromonospora lacustris sp. nov. Routica. Dos miembros de la mezcla de ansamicina son la rifamicina S y la rifamicina SV. Dos otras ansamicinas son

Los derivados de 3-tiometilo de la rifamicina S y de la rifamicina SV.

El microorganismo útil para la preparación de los antibióticos de esta invención se aisló de una muestra de lodo del Lago Rogers, en Connecticut. Este cultivo (Pfizer F.D. 23849), designado Micronomospora lacustris sp. nov. Routien, se ha depositado en la Colección de Cultivo tipo Americano, de Rockville, Md., y se añadió a su colección, como representativa de un cultivo tipo como CCTA 21975.

Los medios de identificación usados para la caracterización de M. lacustris y las referencias para su composición son las siguientes:

1. Agar de Bennett (y 0.1 por ciento de CaCO_3) - Waksman, S.A. Los Actinomicetos volumen 2, 1961. Medio 30 en la página 331.
2. Agar de Emerzon (y 0.1 por ciento de CaCO_3) - Waskman, 1961. Medio 28 en la página 331.
3. Agar de Pasta de Tomate de Harina de Avena (y 0.1 por ciento de CaCO_3) - Waskman, 1961. Medio 34 en la página 332.
4. Agar de Glucosa y Asparagina (y 0.1 por ciento de CaCO_3) - Waskman, 1961. Medio 2 en la página 328.
5. Agar Glucosa-Extracto de Levadura (y 0.1 por ciento de CaCO_3) - M. J. Weinstein y otros. Agente Antimicrobianos y Quimioterapia, página 436, 1968.

6. Almidón (a) - Waksman, 1961. Medio 21 en la página 330.
 - (b) - Como el anterior, pero con 1% de Extracto de levadura añadido
 - (c) - Gordon y Mihm, Diario de Bacteriología 73, 15-27, 1957
 - (d) - Almidón de papa 20.0 gramos
Cloruro de amonio 0.5 gramos
Agar 15.0 gramos
Agua destilada 1.0 litro.
7. Gelatina - Waskman, 1961, Medio 20 en la página 330.
8. Tirosina - Waskman, 1961. Medio 11 en la página 329.
9. Czapek-Sucrosa - Waksman, 1961. Medio 1 en la página 328.
10. Rebanadas de papa - Luedemann, G.M. y B. Brodsky, Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia, páginas 47 a 52, 1965.
11. Rebanadas de papa más CaCO_3 - Luedemann y Brodsky, 1965.
12. Zanahorias.
13. Agar de Agua de la Llave (2 por ciento).
14. Agar de Peptona-Hierro - Waksman, 1961. Medio 38 en la página 332.
15. Leche Descremada Difco.

16. Medio CCTA 172 - Catálogo de Cepas de la CCTA, 9a. Edición, página 172, 1970.

17. Caldo de Nitrato de Dextrosa - Waksman, 1961. Medio 1 en la página 328.

18. Caldo de Nitrato Orgánico - Waksman, 1961. Medio 37, en la página 332.

19. Invertasa de Sucrosa - M. Levine y H. W. Schoenlein, Una Compilación de Medio de Cultivo, 1930. Medio 622 en la página 176.

20. Celulosa - Levine y Schoenlein, 1930. Medio 2511 en la página 823.

21. Celulosa - H. L. Jensen, Expediente de la Sociedad Linnean N.S. Wales, 55, 231 (1930).

22. Utilización de Nitrógeno - Weinstein y otros, Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia, página 437, 1968.

23. Utilización de Carbohidrato - Weinstein y otros.

El M. lacustris se plantó en tubos o placas de petri por lo menos en duplicado para algunas pruebas a gran alcance. La incubación se efectuó a 28° C., excepto en donde se manifiesta lo contrario. Se hicieron lecturas a varios intervalos hasta de 14 días, con algunas pruebas continuándose durante períodos de tiempo más prolongados. Las designaciones de color se refieren al color de las virutas en el "Manual de Armonía de Color", 4a. Edición, 1958, publicado por Container Corporation of América, E.U.A., pero los términos descrip-

tivos son aquellos del investigador. Los métodos son principalmente aquellos descritos por M. J. Weinstein y otros, en Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia páginas 435 a 437 (1967/1968). La descripción de M. lacustris CCTA 21975 es la siguiente:

Característico del género Micromonospora, M. lacustris, no tiene micelio aéreo. Hay solamente esporas en el micelio del substrato y éstas salen individualmente en la hifa. Mejoras producidas en agar de agua de la llave son raras, terminales, asentadas, colocadas al azar en el cultivo, en su mayoría de 1.1 a 1.5 micrones de ancho, algunas veces de 2.0 micrones de ancho. Se encuentran hinchamientos intercalados infrecuentes. En el agar de glucosa y extracto de levadura, las esporas son semejantes, pero algunas veces son numerosas en manchas parduscas en el micelio.

El extracto de levadura y la NZ-Amina A (Sheffield Chemical Co.) proporcionan buen crecimiento. No se utiliza nitrato de sodio, asparagina ni ácido glutámico. El crecimiento es de insatisfactorio a bueno, en el Medio 172 de la CCTA a temperaturas de 21°, 28° y 37° C., pero hay crecimiento no continuo a temperatura de 45° C.

Reducción del nitrato: ninguna reducción de nitrato en nitrito en 21 días, ya sea en caldo de nitrato de dextrosa o en caldo de nitrato orgánico.

Producción de H₂S (4 días, prueba de tira de acetato

de plomo) - producción de agar de peptona - hierro.

Celulosa: ningún crecimiento en ningún medio aún después de 38 días.

Gelatina: licuada.

Almidón: ninguna hidrólisis en el medio 6a y 6b pero buena hidrólisis en el medio 6c y 6d.

Inversión de sucrosa: positiva.

Leche Descremada: ningún cambio a los 21 días, ocurriendo posteriormente coagulación y peptonización parcial.

Utilización de carbono: utilizado - glucosa, galactosa, fructosa, D-manosa, d(-)ribosa, almidón, sucrosa, trehalos y xilosa; no utilizados - adonitol, L-arabinosa, celulosa, dulcitol, inositol, D-manitol, rafinosa, ramosa y d(-)sorbitol; variable - lactosa y D-melibiosa.

Los datos adicionales del cultivo pertenecientes a M. lacustris CCTA 21975 aparecen en el siguiente cuadro:

Medio	Crecimiento	Color del micelio	Pigmento Soluble
Agar de Bennet + CaCO ₃	Bueno, plano con cierta aspereza	Anaranjado brillante (casi de 4 pa)	Amarillo brillante
Agar de Emerson + CaCO ₃	Bueno, levantado, áspero, arrugado	Amarillo brillante (5 pa a 5 pc)	Pardo
Pastona de tomate y harina de avena + CaCO ₃	De bueno a excelente, plano, liso	Anaranjado (de 4 pa a 5 ia)	Ligeramente pardo
Glucosa-extracto de levadura + CaCO ₃	De moderado a bueno, plano o levantado y áspero	Anaranjado (de 4na a 5 pa)	Pardo
Agar de glucosa - asparagina) CaCO ₃	Esencialmente ningún crecimiento		
Agar de Czapek y sucrosa	Esencialmente ningún crecimiento		
Agar de tirosina	Esencialmente ningún crecimiento		
Rebanadas de Papa	Bueno, áspero o delgado, plano	Anaranjado rojizo (de 5pc a 6pa) ninguno	
Rebanadas de Papa + CaCO ₃	Bueno, arrugado	Anaranjado rojizo (casi de 3 pe) Ninguno	
Gelatina	De Insatisfactorio a moderado, delgado, plano	Anaranjado-amarillento pálido (de casi 3 pe) Ninguno	
Zanahorias	Ningún crecimiento		
Agar de almidón	Esencialmente ningún crecimiento en medio 6a y 6b, pero buen crecimiento en 6e y 6d.		

Una cepa mutante (Pfizer F.D. 24189), desarrollada por tratamiento mutagénico de M. lacustris CCTA 21975, se depositó con la Colección de Cultivos Americana y se designó CCTA 21974. La cepa mutante tiene un color más opaco que el cultivo original en agar de glucosa-levadura más CaCO_3 y otros medios. La cepa mutante produce más esporas y esporas ligeramente más grandes que el cultivo original. La cepa mutante, en contraste con el cultivo original, no puede utilizar fructosa y lactosa como las fuentes o procedencias de carbono. La cepa mutante produce menores cantidades de rifamicina S y rifamicina SV en los métodos de fermentación empleados que el cultivo original.

El cultivo de M. lacustris de preferencia se efectúa en medios nutritivos acuosos a temperatura de aproximadamente 24° a 36° C., y bajo condiciones aeróbicas, sumergidas, con agitación. Los medios nutritivos que son útiles para dichos objetos incluyen una fuente o procedencia de carbono asimilable, tales como azúcares, almidón, glicerol y melasa; una fuente o procedencia de nitrógeno orgánico, tal como caseína, sustancia digestiva enzimática de caseína, harina de carne, gluten de trigo, harina de semilla de algodón, harina de frijol de soya y harina de cacahuato. Una fuente o procedencia de sustancias de crecimiento tales como materiales solubles de destilería y/o extracto de levadura, así como sales tales como cloruro de sodio, acetato de amonio, sulfato de amonio, fosfato

de potasio y minerales de traza tales como hierro, magnesio, zinc, cobalto y manganeso puede utilizarse también con resultados ventajosos. Si se encuentra formación de espuma excesiva durante la fermentación, pueden añadirse al medio de fermentación agentes antiespumantes, tales como aceites vegetales o siliconas. El pH de la fermentación tiende a permanecer más bien constante, pero si se encuentran variaciones, puede también añadirse al medio un agente de estabilización, tal como carbonato de calcio. La aereación del medio en tanques para crecimiento sumergido, de preferencia se mantiene a razón de aproximadamente 1/2 a 2 volúmenes de aire libre por volumen de caldo por minuto. La agitación puede mantenerse por medio de agitadores que son por lo general conocidos para aquellas personas relacionadas con la industria de la fermentación. Desde luego deben mantenerse condiciones asépticas a través del traslado del microorganismo y a través de su etapa de crecimiento.

El inóculo para la preparación de la mezcla antibiótica puede obtenerse, empleando crecimiento de tubos inclinados de M. lacustris en medios tales como el medio 172 de la CCTA, al cual se ha hecho referencia en lo que antecede. El crecimiento puede utilizarse para inocular ya sea matraces de agitación o tanques de inóculo o alternativamente los tanques de inóculo pueden sembrarse de los matraces de agitación. El crecimiento de los microorganismos por lo general llega a

su máximo aproximadamente de dos a tres días. Sin embargo, las variaciones en el equipo usado, la aereación, régimen de agitación y otros factores pueden afectar la velocidad con la cual se llega al crecimiento máximo. Por lo general, la fermentación se lleva a cabo hasta que se imparte una actividad antimicrobiana considerable al medio, un período de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 4 días, siendo suficiente para la mayoría de los objetos.

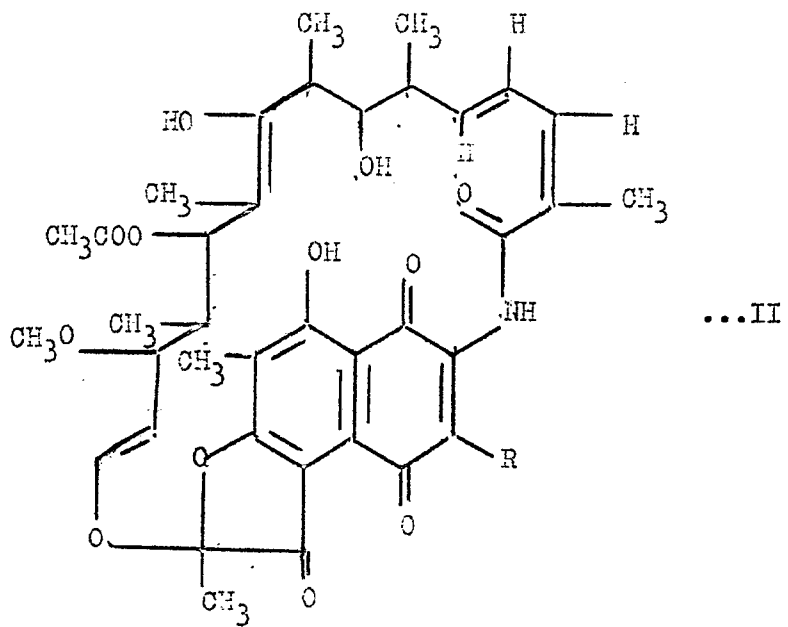
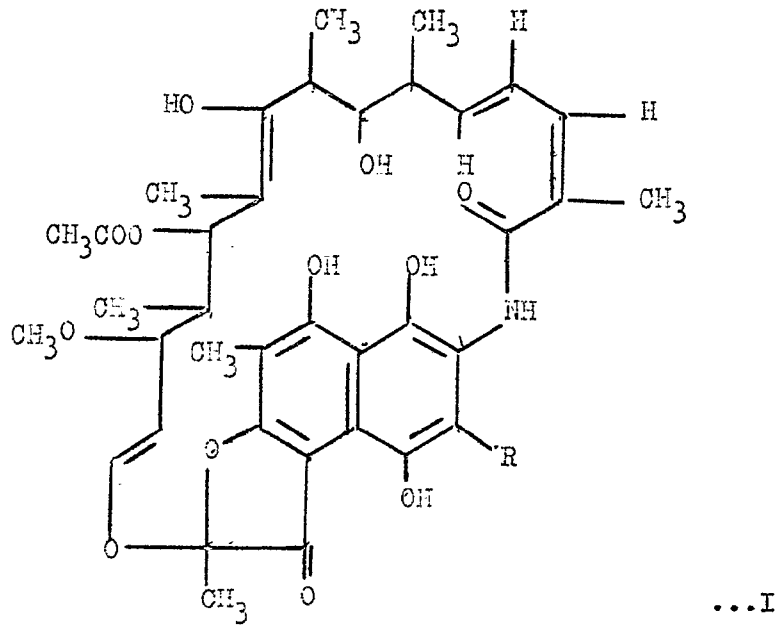
El procedimiento de la producción de antibióticos, convenientemente es seguido durante la fermentación mediante ensayo biológico del caldo empleando una cepa sensible de Staphylococcus aureus. Se emplea la técnica del ensayo de placa normal, en donde la zona de inhibición que rodea un disco de papel de filtro, saturado con el caldo, se utiliza como una medida de la potencia de antibiótico. Después de que el caldo de fermentación ha llegado a un nivel de potencia del antibiótico, el pH por lo general es de aproximadamente 7.5 a 8.5, y el micelio se remueve mediante filtración o centrifugación. Puedan usarse varios tipos de equipo tales como prensas de filtro, centrifugas, etc.

La cromatografía de capa delgada empleando gel de sílice es una herramienta útil para analizar la mezcla de antibióticos que se produce mediante M. lacustris en medios de fermentación y la composición de materiales crudos y purificados que se extraen de los caldos de fermentación clarificados.

La resolución de los componentes de la mezcla de antibióticos depende de manera importante de la carga de antibiótico del sistema. Una potencia de antibiótico demasiado pequeña deja de revelar los componentes antibióticos secundarios; una potencia del antibiótico demasiado considerable da por resultado un efecto que ofrece resistencia con una resolución insatisfactoria.

El sistema para la cromatografía de capa delgada, es la capa superior preparada de acetato de etilo, tetrahydrofurano y agua (4:1:5). La detección bioautográfica de los componentes antibióticos puede lograrse por medio de un recubrimiento de una capa delgada de agar, sembrada con una cepa sensible de Straphylococcus aureus, u otro organismo sensible. Los cromatogramas de capa delgada, después de desarrollarse, pueden también examinarse visualmente. El antibiótico presente en la mezcla de antibióticos se colorea considerablemente con varios tonos de anaranjado, amarillo y rosa.

Las rifamicinas producidas mediante M. lacustris son compuestos de las fórmulas:



R

(a) - H

(b) - S - CH₃

La porción predominante (\sim 90 por ciento) de la mezcla de antibióticos que se produce por M. lacustris que se establece mediante análisis elemental, espectrográfico de masa y datos de resonancia magnética nuclear, se representa mediante 3-tiometilrifamicina S (IIb) y 3-tiometilrifamicina SV (Ib). Los componentes secundarios mayores (\sim 9 por ciento) son rifamicina S (IIa) y rifamicina SV (Ia). Se producen cantidades más pequeñas de rifamicina S y de rifamicina SV mediante la cepa mutante M. lacustris CCTA 21974.

Además de las rifamicinas, se produce una nueva ansamicina designada Compuesto 32,656 (\sim 0.9 por ciento) y un número de otras ansamicinas en cantidades de traza que ascienden a un total de aproximadamente 0.1 por ciento de la mezcla de antibióticos.

Los equilibrios de oxidación-reducción establecidos para la rifamicina S y la rifamicina SV existen para los derivados de 3-tiometilo de estos antibióticos. La rifamicina SV se oxida mediante aire o mediante dióxido de manganeso en rifamicina S. La rifamicina S se reduce rápidamente en rifamicina SV mediante tratamiento con ácido ascórbico. Las reacciones semejantes de oxidación-reducción funcionan para la 3-tiometilrifamicina S y 3-tiometilrifamicina SV.

La hidrogenación de la 3-tiometilrifamicina S en una solución de etanol en presencia de 5 por ciento de paladio sobre carbono hasta que se consuman 8 equivalentes de hidrógeno,

la remoción del catalizador mediante filtración y la evaporación del material filtrado rinde la hexahidro-3-tiometilrifamicina SV. La oxidación de este compuesto con dióxido de manganeso activado, proporciona los derivados de hexahidro de la 3-tiometilrifamicina S; de manera semejante, la hidrogenación del compuesto 32,656 proporciona el derivado de hexahidro.

Los componentes de la mezcla de antibióticos puede recuperarse del caldo de fermentación mediante un número de procedimientos diferentes, incluyendo extracción por solvente y cromatografía de columna o combinaciones de los mismos. Son útiles varios solventes orgánicos para extraer los antibióticos del caldo clarificado. La acetona de metilisobutilo es un solvente particularmente efectivo. La extracción por solvente, de preferencia se lleva a cabo usando un volumen del solvente aproximadamente igual a más o menos una quinta parte del volumen del caldo del cual se desea recuperar la mezcla de antibióticos. Dependiendo de los volúmenes del caldo involucrados, son útiles para objetos de extracción varias piezas del equipo tales como embudos de separación, tanques agitados y dispositivos extractores mecánicos tales como separadores centrífugos.

Las ansamicinas de preferencia se separan y se aíslan en el estado reducido. Esto puede lograrse añadiendo ácido ascórbico a todo el caldo, antes de la filtración a un nivel de aproximadamente 2 gramos por gramo de la mezcla de antibió-

ticos y agitándose durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Alternativamente, los antibióticos pueden reducirse con ácido ascórbico en una de las etapas de recuperación y concentración.

El método de preparación preferido y la recuperación de los componentes de la mezcla de antibióticos es el siguiente: el caldo clarificado se ajusta a un pH de 4.0 a 4.5 y se extrae con aproximadamente una quinta parte del volumen de cetona de metilisobutilo. La cetona se remueve al vacío y se reemplaza por etanol industrial. La solución de etanol se desgrasa mediante extracción repetida con éter de petróleo. Las ansamicinas se reducen con ácido ascórbico, el etanol se remueve al vacío y el residuo se absorbe en cloroformo. El cloroformo se evapora al vacío y el residuo se cromatografía sobre una columna de gel de sílice usando acetato de etilo con concentraciones aumentadas de acetona como el solvente de desarrollo. Los productos de la columna son seguidos por cromatografía de capa delgada y bioensayo. Los productos de oxidación activos se combinan correspondientemente. El compuesto 32,656 está en los productos de destilación anteriores junto con cantidades de traza de otras ansamicinas. La concentración de la acetona en la mezcla de desarrollo de acetato de etilo y acetona se eleva gradualmente hasta aproximadamente 35 a 50 por ciento. El producto destilado se eluye y se concentra rindiendo 3-tiometilrifamicina SV cristalina.

La 3-tiometilrifamicina SV, se convierte fácilmente en 3-tiometilrifamicina S mediante oxidación con aire de preferencia mediante tratamiento con dióxido de manganeso activado que se prepara mediante secado azeotrópico del dióxido de manganeso tal y como se describe en el Diario de la Química Orgánica 34, Número 6, 1979 (1969). Una suspensión espesa de dióxido de manganeso activado, aproximadamente un gramo por gramo del antibiótico, se añade a una solución metanólica de acetato de etilo del antibiótico y se agita durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, a través de cuyo período de tiempo la oxidación se completa prácticamente. La mezcla de reacción se clarifica mediante filtración o centrifugación y el solvente se remueve al vacío.

La presente invención incluye dentro de su alcance los productos antibióticos producidos mediante M. lacustris en formas diluidas, concentrados crudos y también los componentes purificados de los mismos. Todos estos productos novedosos son útiles para combatir microorganismos, especialmente Mycobacterium tuberculosis, Diplococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes y Staphylococcus aureus, incluyendo cepas que son resistentes a otros antibióticos conocidos. Además son útiles como desinfectantes contra dichos microorganismos y como una ayuda para la purificación de cultivos mezclados para objetos de diagnóstico médico e investigación biológica.

El Cuadro I ilustra los espectros del antibiótico de

algunas de estas nuevas ansamicinas. Estas pruebas se llevan a cabo preparando tubos de caldo nutritivo con concentraciones que aumentan gradualmente del antibiótico puro y luego sembrando los caldos con el organismos específico citado. La concentración inhibitoria mínima que se indica en el cuadro I es la concentración mínima del antibiótico (en microgramos/mililitro) a la cual el microorganismo dejó de crecer. Las pruebas se llevaron a cabo bajo condiciones normalizadas, tal y como se describe en el Expediente de la Sociedad Biológica y Médica Experimental, 122, 1107 (1966). Los Cuadros II y III ilustran la actividad in vivo de estos nuevos antibióticos en ratones infectados experimentalmente.

Cuadro I

<u>Concentración Inhibitoria Mínima (microgramos/mililitro)</u>				
<u>Antibiótico</u>	<u>M. tuber. H RV 37</u>	<u>Strepto- coccus pyogenes</u>	<u>Staphylo- coccus aureus</u>	<u>S. aureus (multirresis- tente)</u>
3-tiometilrifamicina SV.	0.015	0.0019	0.0019	0.0019-0.0039
3-tiometilrifamicina S.	0.006	0.0009	0.0004	0.0012-0.0039
Compuesto 32,656	0.1	0.0312	0.0039	0.0012-0.0078

Cuadro II

PD₅₀ , miligramos/kilogramo*

Antibiótico	Diplo-	Strepto-	Staphylo-	
	cocci oral	cocci oral	Oral	Subcutáneo
3-Tiometilrifamici- cina SV	8.0	0.22	1.1	0.65
3-tiometilrifamici- cina S.	12.5	0.60	1.4	0.17
Compuesto			1.15	

*Dosis que proporciona una protección del 50 por ciento.

Cuadro III

Infección de M. tuberculosis en Ratones

	Dosis diaria	% de su- pervi- vencia*	Tiempo de supervi- vencia promedio (días)*
3-tiometilrifamicina SV.	5.0	100	53.0
	0.5	70	44.3
Control	0	20	37.7

*Evaluado a 53 días posteriores al desafío.

Los antibióticos de esta invención pueden adminis-
trarse mediante vías orales o parenterales para el tratamiento
de animales, incluyendo los seres humanos, de infecciones pneu-

ceólicas, estreptocólicas, estafilocólicas, tuberculosas y otras infecciones sensibles al antibiótico. Por lo general, estos antibióticos deseablemente se administran en dosis orales diarias de 0.5 a 1 gramo o inyecciones parenterales de 100 a 500 miligramos, dependiendo del tipo y seriedad de la infección y el peso del paciente que se está tratando.

Los compuestos de esta infección pueden administrarse solos o en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables y dicha administración puede llevarse a cabo en dosis individuales y múltiples.

Para objetos de administración oral, puede emplearse una pastilla que contiene varios excipientes tales como citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de dicalcio, junto con varios desintegrantes, tales como almidón, ácido algínico, y ciertos silicatos complejos junto con agentes de ligazón, tales como pirrolidona de polivinilo, sucrosa, gelatina y goma de acacia. Además, son frecuentemente útiles para objetos de formar pastillas los agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco. Las composiciones sólidas de un tipo semejante, pueden también emplearse como materiales de relleno en cápsulas de gelatina suaves y duras, llenadas; los materiales preferidos incluyen lactosa así como polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desean suspensiones acuosas y/o elixires para administración oral, el ingrediente activo esencial en las mismas, puede combinarse

con varios agentes edulcorantes o de sabor, materia colorante o tintes y si se desea, agentes emulsionantes y/o de suspensión, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerol y varias combinaciones de los mismos.

Para objetos de administración parenteral, las soluciones de estos antibióticos en aceite de ajonjolí o de cacahuate o en propilenglicol acuoso se pueden emplear, así como las soluciones acuosas estériles de las sales de metal alcalino o de metal alcalinotérreo solubles en agua, correspondientes. Dichas soluciones acuosas deben estabilizarse apropiadamente si es necesario, y el diluyente líquido puede primero hacerse isotónico con una cantidad suficiente de una solución salina o glucosa.

Se proporcionan los siguientes ejemplos a fin de ilustrar más completamente la invención. Debe quedar comprendido que estos ejemplos son para objetos ilustrativos únicamente y que la invención no se destina a quedar limitada a los detalles específicos de los ejemplos.

EJEMPLO I

Se prepara un medio acuoso estéril que tiene la siguiente composición:

	<u>Gramos por Litro</u>
Almidón	20.0
Substancia digestiva enzimática de caseína	5.0

	<u>Gramos por Litro</u>
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	10.0
K ₂ HPO ₄	0.5
CaCO ₃	4.0

Las células de un tubo inclinado de M. lacustris, CCTA 21975 se trasladan hacia una serie de matraces Fernback de 3 litros, cada uno de ellos conteniendo un litro de este medio y se agitan durante de 3 a 4 días a temperatura de 28° C.

Se traslada hasta un fermentador aproximadamente 1 por ciento en volumen/volumen del inóculo que se ha desarrollado, cuyo fermentador contiene 567.700 litros de un medio estéril de la siguiente composición:

	<u>Gramos/Litro</u>
Almidón	25.0
Substancia digestiva enzimática de caseína	15.0
dl-metionina	1.0
Acetato de amonio	0.5
Sulfato de amonio	0.1
K ₂ HPO ₄	0.4
Sucrosa	1.0
CaCO ₃	4.0
Harina de carne	10.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1

	<u>Gramos por Litro</u>
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.002
MnCl ₂	0.002
COCl ₂ ·6H ₂ O	0.002

La temperatura se mantiene a aproximadamente 30° C., y el caldo se agita a 1150 revoluciones por minuto y se aerea a razón de medio volumen de aire por volumen de caldo por minuto. Después de 35 a 45 horas, 5 por ciento en volumen/volumen de este inóculo desarrollado se translada a un fermentador que contiene 3,785 litros del medio estéril descrito en lo que antecede. La temperatura se mantiene a 30° C., con aereación a medio volumen de aire por volumen de caldo por minuto y agitación a 600 revoluciones por minuto. Se añade aceite de frijol de soya tal y como sea necesario para controlar la formación de espuma excesiva. Después de 50 a 60 horas, del 5 al 10 por ciento en volumen/volumen de este inóculo desarrollado se translada a un fermentador que contiene 37,850 litros del medio estéril que es igual que aquel descrito en lo que antecede, pero sin la harina de carne. La temperatura se mantiene a 30° C., la aereación es a régimen de medio volumen de aire por volumen de caldo por minuto y la agitación es a 380 revoluciones por minuto. Se añade aceite de frijol de soya tal y como sea necesario para controlar la espuma. Se añade sucrosa o dextrosa a intervalos de 24 horas, hasta un nivel de aproximadamente 0.1 por ciento en peso/volumen.

Después de 90 a 120 horas, el caldo de fermentación

se filtra y el pH se ajusta a un valor de 4.0 a 4.5 en presencia de 5 a 10 por ciento de cetona de metilisobutilo. El caldo se extrae luego con 9,462 litros de cetona de metilisobutilo por medio de un extractor Pokbielniak y un separador centrífugo. La extracción por solvente se concentra al vacío hasta de 1/10 a 1/20 volúmenes y el pH se ajusta a 5.5 a 6.5 con amoníaco o una solución al 10 por ciento de K_2HPO_4 .

El solvente (aproximadamente 7.570-0 litros) se remueve al vacío y se reemplaza por etanol 3A. La solución de etanol se concentra al vacío hasta aproximadamente 75.700 litros, la cual se desgrasa mediante extracción repetida con éter de petróleo. A la solución etanólica se añade ácido ascórbico (aproximadamente 2 gramos por gramo de la mezcla de antibiótico) y la solución se agita a temperatura ambiente, durante más o menos 30 minutos. La solución etanólica se concentra al vacío, manteniendo el pH a un valor de 6 a 7 si es necesario, hasta que se forme un jarabe delgado que luego se absorbe en cloroformo.

La solución de cloroformose concentra hasta formar un jarabe que luego se cromatografía sobre una columna de gel de sílice y se desarrolla con acetato de etilo que contiene incrementos al 5 por ciento de acetona. Los productos destilados de la columna son seguidos por cromatografía de capa delgada y bioensayo y los productos destilados se combinan correspondientemente. Los productos destilados iniciales

contienen el compuesto 32,656 y cantidades de traza de rifamicina S, rifamicina SV y otras ansamicinas. El eluato del producto destilado cuando se concentra rinde 3-tiometilrifamicina SV cristalina.

EJEMPLO II

Se repite el método del Ejemplo I con M. lacustris CCTA 21974 en vez de CCTA 21975. Se obtienen resultados comparables con la excepción de una producción por fermentación de cantidades más pequeñas de rifamicina S y de rifamicina SV.

EJEMPLO III

Se prepara una composición farmacéutica sólida seca, mezclando los siguientes materiales juntos en las proporciones en peso que se especifican a continuación:

3-Tiometilrifamicina SV	50
Citrato de sodio	25
Acido algínico	10
Pirrolidona de polivinilo	10
Estearato de magnesio	5

Después de que la composición seca se mezcla completamente, se perforan las pastillas de la mezcla resultante siendo cada pastilla de un tamaño tal como para que contenga

500 miligramos del ingrediente activo. Se preparan otras pastillas de manera semejante que contienen 250, 100 y 50 miligramos del ingrediente activo usando la cantidad apropiada de 3-tio metilrifamicina SV, en cada caso.

EJEMPLO IV

Se preparan ampollitas que contienen cantidades pesadas de la sal de sodio estéril de la 3-tiometilrifamicina SV. Estas ampollitas se reconstituyen para administración parenteral hasta 100 ó 200 miligramos por mililitro, con agua estéril o una solución de dextrosa al 5 por ciento.

EJEMPLO V

Datos Analíticos

<u>3-Tiometilrifamicina S</u>	
Carbono	61.48
Hidrógeno	6.70
Nitrógeno	1.90
Azufre	4.15

Los datos del espectrómetro de masa y de resonancia magnética nuclear son compatibles con la sal de sodio de la 3-tiometilrifamicina SV ($C_{38}H_{48}NaO_{12}NS$). Sus valores máximos de absorción de luz ultravioleta en HCl de 0.01M en una solu-

ción de metanol ocurren a 225, 305 y 440 milimicrones.

Un gránulo de KBr muestra absorción característica en la región infrarroja a las siguientes longitudes de onda en micrones: 2.90, 3.40, 5.25, 5.95, 6.50, 7.00, 7.25, 7.55, 8.15, 8.70, 9.30, 9.45, 10.30, 10.65, 11.35, 12.50, 12.80, 13.30 y 13.75.

Rifamicina S

La identidad de la rifamicina S que se produce mediante M. lacustris, se estableció mediante análisis elemental y comparaciones con espectros de absorción de luz ultravioleta e infrarroja que se han publicado.

Rifamicina SV

La identidad de la rifamicina SV que se produce mediante M. lacustris se estableció mediante análisis elemental y comparaciones de los espectros de absorción de luz ultravioleta e infrarroja, con datos ya publicados.

Compuesto 32,656

Carbono	58.19%
Hidrógeno	5.97%
Nitrógeno	3.17%
Azufre	3.52%
Oxígeno (mediante diferencia)	29.15%

El compuesto es ligeramente soluble en agua y éter de petróleo y fácilmente soluble en metanol, etanol, acetona y acetato de etilo.

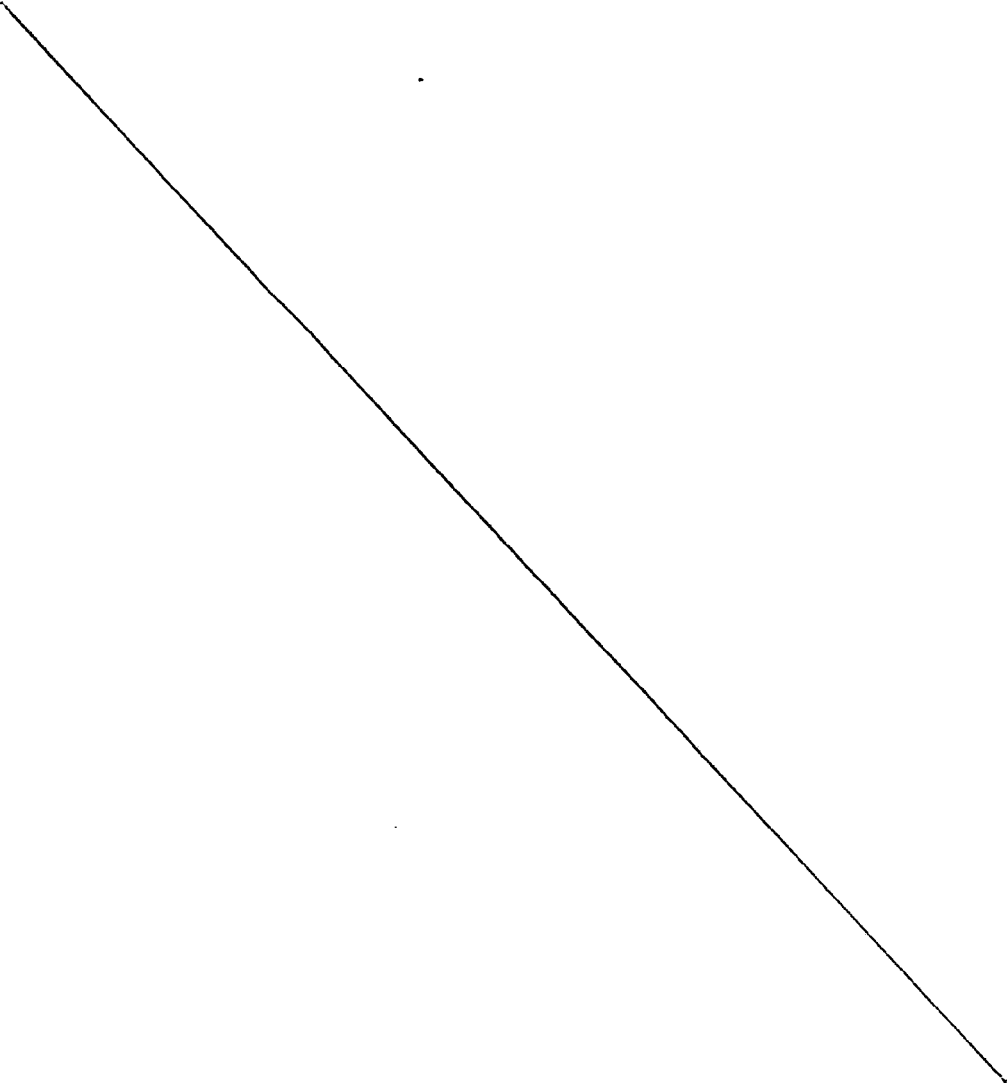
Sus valores máximos de absorción de luz ultravioleta en HCl de 0.01 M en una solución de metanol ocurren a 225, 253 (inflexión), 300 y 414 milimicrones, con valores de $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ de 465, 280, 290 y 150, respectivamente. Cuando se forman en gránulos en KBr (espectro infrarrojo fijado) la absorción característica de la región infrarroja ocurre a las siguientes longitudes de onda en micrones: 2.90, 3.40, 5.75, 6.05, 6.30, 6.60, 6.80, 6.95, 7.25, 7.55, 7.95, 8.65, 9.40, 10.25, 10.55, 11.35, 12.45 y 13.20.

EJEMPLO VI

La hidrogenación de una solución etanólica de la 3-tiometilrifamicina S en presencia de paladio sobre carbono al 5 por ciento hasta que se consumen 8 equivalentes de hidrógeno, la remoción del catalizador mediante filtración y evaporación del material filtrado, rindió hexahidro-s-tiometilrifamicina SV, que se identifica mediante los datos del espectrómetro de masa. La oxidación de este compuesto con dióxido de manganeso activado rinde hexahidro-3-tiometilrifamicina S. Las propiedades del antibiótico de estos derivados de hexahidro son comparables con aquellos de los compuestos originales.

EJEMPLO VII

El derivado de hexahidro del Compuesto 32,656, con actividad antibiótica comparable a aquella del compuesto original, se prepara hidrogenando el Compuesto 32,656, mediante el método del Ejemplo VI.



REIVINDICACIONES

5 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10 1ª.- Un método mejorado para producir un antibiótico de ansamicina cultivando un microorganismo, caracterizado porque el Micromonospora lacustris sp. nov. kontien se cultiva bajo condiciones aeróbicas sumergidas en un medio nutritivo acuoso que contiene una fuente o procedencia asimilable de carbono y nitrógeno hasta que se obtiene una actividad antibiótica considerable.

15 2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado en que la rifamicina S se separa de la mezcla de antibiótico resultante.

20 3ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado en que la rifamicina SV se separa de la mezcla de antibiótico resultante.

4ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado en que la 3-tiometilrifamicina S, se separa de la mezcla de antibiótico resultante.

25 5ª.- Un método según la reivindicación 1ª, ca-

racterizado en que la 3-tiometilrifamicina SV se separa de la mezcla de antibiótico resultante.

5 6ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado en que se separa de la mezcla de antibióticos resultante un compuesto de una sustancia antibiótica 32,656 que en forma cristalina disuelta en HCL 0.01 en meranol, exhibe valores máximos de absorción en la región de luz ultravioleta del espectro a 225, 253 (inflexión), 300 y 414 milimicrones con valores de $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ de 465, 280, 290 y 150 respectivamente; teniendo la composición promedio en peso de 58,19
10 por ciento de carbono, 5.97 por ciento de hidrógeno, 3.17 por ciento de nitrógeno, 3.52 por ciento de azufre y 29.15 por ciento de oxígeno (mediante diferencia); y cuando se granula en KEr exhibe absorción característica en la región infrarroja a las siguientes longitudes de onda en micrones:
15 2.90, 3.40, 5.75, 6.05, 6.30, 6.60, 6.80, 6.95, 7.25, 7.55, 7.95, 8.65, 9.40, 10.25, 10.55, 11.35, 12.45 y 13.20.

7ª.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 2ª a 6ª, caracterizado en que el material separado se hidrogena para formar el derivado de hexahidro.
20

8ª.- Un método mejorado para producir un antibiótico de ansamicina cultivando un microorganismo.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para
25 los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta y una hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

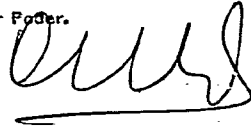
10. SET. 1976

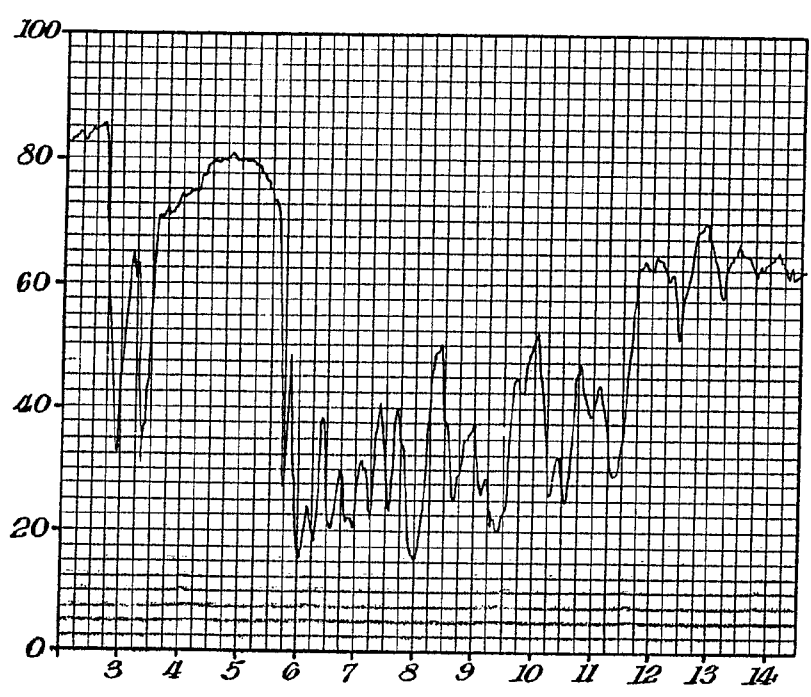
P.A.

5

Fernando de Elizaburu

Por Poder.





Fernando de Elizaburu
Por Poder