

1052  
P.- 59.917

1203-77/3484  
PT/GH

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INTRODUCCION

a nombre de CHINOIN Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek  
Gyára RT

entidad húngara

establecida en 1-5, Tó utca, Budapest IV., Hungría.

por: "UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCION MICROBIOLÓGICA  
DE PARVULINAS"

(Clase Internacional C12D)

Esta invención se refiere a un procedimiento para la producción microbiológica de parvulinas para fines terapéuticos, así como para alimentación animal.

5 En la década pasada se ha aislado un gran número de antibióticos peptídicos a partir de diferentes Streptomycetos. La estructura química de estos antibióticos varía en un grado considerable. Contienen, además de aminoácidos naturales, aminoácidos que tienen estructuras específicas, y otros componentes, como por ejemplo ácidos  
10 grasos. Estas sustancias pueden ser de importancia, en parte por su valor terapéutico y en parte por sus propiedades activadoras del crecimiento en animales. Muchos antibióticos recientes, no aplicados aún en terapéutica, pueden tenerse en cuenta para el último de los fines indicados.

15 El objeto de la invención es asegurar un procedimiento para producir nuevos antibióticos para alimentación animal, así como para fines terapéuticos.

La invención se refiere a un procedimiento para la producción biológica de parvulinas, en el que se  
20 cultiva *Streptomyces parvulus*, var. *parvuli* (registrado en el National Institute of Health de Budapest, el 31 de enero de 1967 con el nº 36) en condiciones aerobias en un medio que contiene proteínas complejas, hidratos de carbono y sales inorgánicas, después de lo cual las parvulinas  
25 producidas se recuperan por extracción y eventualmente se

dividen en sus respectivos componentes.

Los antibióticos producidos de acuerdo con el procedimiento según la invención son metabolitos del Actinomyceto I-327, aislado a partir de una muestra de tierra en Hungría. El antibiótico puede recuperarse del caldo de cultivo por los procedimientos usuales de separación, por ej. extracción. El antibiótico obtenido de este modo se ha denominado parvulina.

Una investigación más detallada ha mostrado que la parvulina era un péptido ácido similar en ciertos aspectos a los antibióticos peptídicos ácidos glumamicina (J. Antibiotics, Ser. A. 15, 1-6, 1962), anfomicina (Antibiotics and Chemotherapy, 3, 1239-1242, 1953), aspartocina (Antibiotics Annual, 1959/1960, 194-198, 1960), y zaomicina (J. Antibiotics, Ser. A, 7, 134-136, 1954), pero puede diferenciarse de ellos por sus propiedades, que se describirán más adelante.

La cepa productora de antibiótico del procedimiento según la invención se caracteriza de acuerdo con las regulaciones de los capítulos respectivos del "Methods Manual" (International Cooperative Project for the Description of Type Cultures of Streptomycetes), Delaware, Ohio, 1964, y de Hütter, R.: "Systematik der Streptomycetes", Basilea, 1967, como sigue:

Micromorfología: los esporóforos constan de es

pirales sueltas múltiples con esporas de forma oval; su número es como máximo de 50, y mínimo de 2-3. La proporción porcentual de las espirales en diferentes medios es variable. En agar de harina de avena: rectus flexibilis, 1-2%, retinaculum, 10% y spira 88%; sobre agar de sal inorgánica-almidón: rectus flexibilis, 5%, retinaculum, 50% y spira, 45%; sobre agar de extracto de levadura-malato: no hay espiras reales, y sólo pueden observarse formaciones sueltas alargadas de tipo retinaculum, con algunas transiciones en la dirección de flexibilis y rectus. No pueden observarse esporangios globulares, flagelos en esporas ni fragmentación del micelio del sustrato. La superficie de las esporas es lisa.

Características de los cultivos: Ni el color del micelio del sustrato ni el del pigmento soluble tienen propiedades indicadoras. No se observó producción de melanina (reacción de cromogenicidad) ni en agar de peptona-extracto de levadura-hierro ni en agar de tirosina. Se produjo una reducción muy fuerte de nitratos en cultivo líquido de Bactonitrato, ya en el séptimo día.

Agar de extracto de levadura y extracto de malato: micelio aéreo gris abundante: el séptimo día, "d" (gris claro), al cabo del 14º día, "3 fe" (gris parduzco claro). El micelio del sustrato es pardo amarillento, y al 14º día "Co40". No hay pigmento soluble, o a veces trazas de amarillo claro.

Agar de harina de avena: micelio aéreo gris abundante: "2 fe" (moderadamente gris), después "3 fe". El micelio del sustrato es pardo amarillento: "Co 38". No hay pigmento soluble.

5           Agar de glicerina-esparraguina: micelio aéreo poco desarrollado, detectable sólo en trazas. El micelio de sustrato es pardo amarillento, "Co 38"; no hay pigmento soluble.

10           Agar de patata: micelio aéreo gris abundante, pulverulento. El micelio de sustrato, moderadamente desarrollado, fuertemente rugoso, de color pardo claro, No hay pigmento soluble.

15           Agar de almidón de Gauze: micelio aéreo desarrollado, gris, pulverulento. Micelio de sustrato poco desarrollado, incoloro, posteriormente amarillo pálido, similar a un velo. No hay pigmento soluble.

20           Agar de glucosa: micelio aéreo poco desarrollado, blanco grisáceo; pulverulento; micelio de sustrato moderadamente desarrollado, incoloro, rugoso. No hay pigmento soluble.

Agar de glucosa-esparraguina: Micelio aéreo en trazas. Micelio de sustrato poco desarrollado, incoloro, similar a un velo. No hay pigmento soluble.

25           Agar de glicerina-esparraguina: Micelio aéreo poco desarrollado, pulverulento, blanco grisáceo; micelio

de sustrato poco desarrollado, similar a un velo, de color amarillo claro. No hay pigmento soluble.

5 Agar de glicerina-glicina: micelio aéreo en trazas. Micelio de sustrato moderadamente desarrollado, color pardo amarillento claro, débilmente rugoso, similar a un velo. No hay pigmento soluble.

10 Agar de glicerina-urea: Micelio aéreo en trazas. Micelio de sustrato moderadamente desarrollado, incoloro, después pardo claro, rugoso, similar a un velo. No hay pigmento soluble.

Agar de almidón-caseína: No hay micelio aéreo. Micelio de sustrato moderadamente desarrollado, incoloro, similar a un velo. No hay pigmento soluble.

15 Agar de "Nähr": Micelio aéreo poco desarrollado, gris blanquecino, pulverulento. Micelio de sustrato moderadamente desarrollado, amarillo claro, similar a un velo. No hay pigmento soluble.

20 Agar de sacarosa-nitrato: Micelio aéreo poco desarrollado, pulverulento, color grisáceo; micelio de sustrato poco desarrollado, incoloro, similar a un velo. No hay pigmento soluble.

Agar sintético: Micelio aéreo en trazas. Micelio de sustrato abundante, color pardo claro, rugoso. Pigmento soluble pardo claro muy intenso.

25 Agar de Tripton-extracto de levadura: micelio

aéreo poco desarrollado, color gris claro. Micelio de sustrato escaso, incoloro, similar a un velo. No hay pigmento soluble.

5                   Agar de sal inorgánica-almidón: Micelio aéreo poco desarrollado, gris "2 fe", durante todo el periodo de cultivo. Micelio de sustrato pardo amarillento, al séptimo día "Co40". No hay pigmento soluble.

Espectro de utilización de fuentes de carbono en medio sintético de Fridham y Gottlieb:

10                   - = no hay desarrollo, no hay utilización;  
                      ± = trazas de desarrollo;  
                      + = desarrollo deficiente;  
                      + + = desarrollo moderado;  
                      + + + = desarrollo abundante;

15                   Control positivo (d-glucosa): positivo (+++).  
                      Control negativo (carente de C) : negativo (-).  
                      l-arabinosa (+++) positivo; d-fructosa (+++) positivo; d-  
                      -manita (+++) positivo; rafinosa (-) negativo; ramnosa  
                      (+++) positivo; sacarosa (±) negativo; d-xilosa (+++) po  
20                   sitivo; d-galactosa (+++) positivo; maltosa (+++) positivo;  
                      melibiosa (±) negativo; inulina (-) negativo; dulcita (-)  
                      negativo; salicina (+) débilmente positivo; d-sorbita (±)  
                      negativo; melicitosa (+) negativo; adonita (±) negativo;  
                      trehalosa (+++) positivo; lactosa (+++) positivo; inosita  
25                   (++) positivo.

Con base en la descripción anterior, el *Streptomyces parvulus* I-327 puede considerarse como nueva variante del *Streptomyces parvulus*, y se ha denominado *Streptomyces parvulus* var. *parvuli*.

5                   Según los datos bibliográficos (R. Hütter, "Systematik der Streptomycetes", Basilea 1967) nunca se ha empleado ninguna especie de *Streptomyces parvulus* para la producción de antibióticos similares al antibiótico de la presente invención.

10                   El *Streptomyces parvulus* puede cultivarse según métodos utilizados generalmente para las fermentaciones con Actinomicetos. Como fuente de carbono pueden aplicarse, como las más ventajosas, glucosa o lactosa. Como fuente de nitrógeno pueden emplearse harina de soja, líquido de maceración de maíz, harina de nueces, y además caseína. Pueden usarse NaCl, CaCO<sub>3</sub>, etc. como sales minerales.

15                   La cepa puede mantenerse sobre agar de extracto de patata-glucosa. Su productividad puede influenciarse ventajosamente por medio de una irradiación ultravioleta sobre un medio que contiene antibiótico.

20                   La parvulina puede producirse a cualquier temperatura a la que el *Streptomyces parvulus* var. *Parvuli* alcanza un desarrollo suficiente (24-32°C). No obstante, es preferible mantener la temperatura entre 26°C y 30°C. El medio de cultivo ha de esterilizarse a 120-125°C durante

20-45 minutos.

El pH ha de ser de 7,0 antes de la esterilización. El medio de cultivo estéril se somete a inoculación por medio de una suspensión de esporas o un inóculo vegetativo de *Streptomyces parvulus* var. *parvuli*. El medio em-  
5 pleado para el inóculo vegetativo es idéntico al de la propia fermentación.

La cantidad de inóculo en el depósito de fermentación es de 5 a 10% del medio que ha de inocularse.

10 En el curso de la fermentación, el contenido de antibiótico llega a 400-600  $\gamma$ /ml en la hora 48ª. En las horas 70ª-72ª puede observarse una fragmentación de 5-10% junto a una esporulación deficiente. La actividad biológica del caldo alcanza 1000-1400  $\gamma$ /ml. Paralelamente al consumo de glucosa, el pH se eleva constantemente. Para mejorar la producción de antibiótico, es aconsejable añadir  
15 más glucosa al medio. El contenido de antibiótico puede llegar a 1800-2100  $\gamma$ /ml. La producción posterior se efectúa por la segunda generación del microorganismo. La máxima  
20 concentración de antibiótico puede alcanzarse en la hora 120ª: 2400-2600  $\gamma$ /ml.

En la fotografía microscópica puede observarse fragmentación del 40-50%, rigidez de los micelios y esporulación. El pH se eleva a 7,6-8,1.

25 Cuando se filtra el caldo a pH 3,2-3,6, el anti

biótico está en el micelio y puede recuperarse por extrac-  
ción. La extracción del micelio húmedo puede efectuarse  
por medio de disolventes orgánicos miscibles con agua, o  
al menos parcialmente miscibles, como por ejemplo alcoho-  
5 les (metanol, etanol, butanol, etc,) o acetona.

Después de evaporar el extracto, el antibiótico  
puede precipitarse a partir del residuo con un disolvente  
ligeramente polar: acetato de etilo, éter o acetona. La  
parvulina ácida puede extraerse en forma de su sal a va-  
10 lores de pH de desde 7 a 9, extrayendo con agua a partir  
de su disolución en butanol, y a valores de pH de desde  
3,4 a 3,6, que corresponde a su punto isoeléctrico, de nue-  
vo a la fase orgánica en su forma de ácido libre. La repe-  
tición múltiple de estas operaciones de extracción y re-  
15 -extracción puede aplicarse con éxito para la purificación  
de la parvulina.

La parvulina puede precipitarse a partir de di-  
soluciones acuosas en forma de sus sales insolubles en  
agua. Por adición de  $\text{CaCl}_2$  ó  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  se forma su sal  
20 de Ca ó de Pb. De modo similar pueden aislarse su sal de  
Ag y sus sales con otros diversos metales.

La parvulina producida y purificada por los mé-  
todos antes descritos, no es una sustancia uniforme, co-  
mo se demuestra por una distribución cromatográfica de  
25 Craig en 440 etapas (CCD) efectuada en un sistema de di

solución tampón de cloroformo-metanol-HCl 0,02 N (2:2:1) ó sec-butanol-acetato de etilo-metanol de pH 3,5 (2:8:3:7) respectiv., y también por investigaciones cromatográficas. Los componentes individuales pueden separarse por cromatografía de adsorción sobre una columna de gel de sílice, empleando un sistema disolvente de cloroformo-metanol en el que el tanto por ciento de metanol se aumenta constantemente en el curso de la cromatografía. La parvulina puede dividirse en sus componentes denominados A, B y C, siendo su proporción de 6:1:1. Por consiguiente, la parvulina contiene, junto a su principal componente A, dos componentes biológicamente activos, de tipo peptídico, en cantidades menores.

El contenido cuantitativo y cualitativo de aminoácidos de los componentes individuales (hidrólisis efectuada en HCl 6N a 110°C durante 16 horas) es el siguiente:

Parvulina A: ácido aspártico (4), glicina (3), prolina (1), valina (2), ácido piperídico (1), ácido  $\alpha, \beta$ -diaminobutírico (2).

Parvulina B: ácido aspártico (4), glicina (2), prolina (1), valina (1), ácido piperídico (1), ácido  $\alpha, \beta$ -diaminobutírico (1).

25

Parvulina C: ácido aspártico (4), glicina (1),  
prolina (1), ácido pipercolico (2),  
ácido  $\alpha, \beta$ -diaminobutírico (2).

5 El componente C está exento de valina. Los tres  
componentes contienen un aminoácido no identificado, y ade  
más ácidos grasos de 12 a 13 C.

Análisis elemental de los componentes individua  
les:

10 Parvulina A: C: 50,99 - 51,20 %  
H: 7,50 - 7,55 %  
N: 12,03 - 12,21 %

Parvulina B: C: 48,92 - 49,05 %  
H: 7,21 - 7,43 %  
N: 9,95 - 10,17 %

15 Parvulina C: C: 51,22 - 51,30 %  
H: 7,78 - 7,80 %  
N: 10,96 - 11,00 %

20 La actividad antibacteriana del complejo de par  
vulinas es como sigue:

	Concentración inhibitoria mínima $\gamma$ /ml
Staphylococcus aureus 53 <sup>+</sup>	6
Staphylococcus aureus 80/81 <sup>+</sup>	6
25 Staphylococcus aureus 1115 <sup>++</sup>	6
Staphylococcus aureus Duncan	6

	Concentración inhibitoria mínima $\gamma$ /ml
	0,8
	0,8
5	50
	100-1000
	100-1000
	100-1000
	inactiva
10	+ = polirresistente (resistente a las penicilinas, estreptomicinas y polimixinas)
	++ = resistente a la penicilina

La actividad microbiológica de los componentes individuales no varía de modo importante.

15 La toxicidad intraperitoneal de la parvulina en ratones CBA es: LD<sub>50</sub> = 300 mg/kg.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos del procedimiento según la invención.

Ejemplo 1

20 Un medio de cultivo colocado en cinco matraces Erlenmeyer de 500 ml se inoculó con la suspensión de esporas de Streptomyces parvulus var. parvuli (las esporas se desarrollaron sobre agar de patata-glucosa de la manera usual). Medio de cultivo:

25 2,0% de harina de soja

1,0% de caseína (contenido de materia seca, 10%)  
0,2% de licor de maceración de maíz (material se  
co, 50%)

3,0% de glucosa

5 0,3% de NaCl

0,5% de CaCO<sub>3</sub>

pH antes de la esterilización: 6,9-7,0.

El cultivo se efectuó a 28°C. La fermentación  
llegó en la hora 46-54<sup>a</sup> a un contenido de antibiótico de  
10 500  $\mu$ /ml. El ensayo se efectuó microbiológicamente a pH = 8;  
organismo de ensayo: *Bacillus subtilis* ATTC 6633, de la ma  
nera usual (I. Horváth y Gy. Wix.: *Acta Physiol. Hung.* 4,  
435, 1953). Los cultivos pueden almacenarse durante 9-10  
días a -14 a -16°C sin perder su capacidad productora.

15 Ejemplo 2

Un depósito fermentador de 100 litros se inocu-  
ló con la suspensión de esporas de *Streptomyces parvulus*  
var. *parvuli* (I-327). Medio de cultivo en el fermentador:

20 2,0% de harina de soja

1,0% de caseína (materia seca, 10%)

0,2% de licor de maceración de maíz (materia se  
ca, 50%).

4,0% de glucosa

25 0,3% de NaCl

0,5% de CaCO<sub>3</sub>

hervido juntamente con 0,3% de aceite de palma como agente antiespumante.

pH antes de la esterilización: 6,5-7,0.

La esterilización se efectuó a 121°C durante  
5 30 minutos. La glucosa se esterilizó por separado. Caudal de aire: 100 l/min; giro del agitador: 250 rpm.; temperatura de fermentación: 26-30°C, óptima: 28°C. Al cabo de 48 horas de cultivo, el caldo se transfirió a un fermentador de 1000 litros con un inóculo como máx.  
10 5 a 10%. El medio y el pH de este fermentador eran idénticos a los indicados anteriormente.

Especificación de la fermentación:

Caudal de aire: 700-800 l/min; giro del agitador: 270 rpm.; temperatura: 26-30°C (preferiblemente  
15 28°C). El contenido de antibiótico era de 1800-2100  $\gamma$ /ml en la hora 96ª. La concentración máxima de antibiótico (2400-2600  $\gamma$ /ml) puede alcanzarse en la hora 120ª.

### Ejemplo 3

100 litros de caldo de fermentación, de contenido de antibiótico 1000  $\gamma$ /ml, se acidificaron con una disolución acuosa de ácido oxálico hasta pH 3,4-  
20 -3,6, y se filtraron. El antibiótico se extrajo del micelio con el doble de su peso de acetona. El extracto en acetona se concentró a presión reducida hasta una  
25 décima parte de su volumen. El residuo acuoso se extra

jo a pH 3,3-3,6 con 1/3 de su volumen de butanol. A partir de este extracto butanólico la parvulina se extrajo de nuevo dos veces con 1/5 de su volumen de disolución de bicarbonato de sodio. Después de acidificar a pH 3,3-3,6, el antibiótico se transfirió a una tercera parte de su volumen de butanol. La disolución en butanol se evaporó en vacío. El antibiótico se precipitó a partir del residuo con acetato de etilo. Rendimiento: 52%.

#### 10 Ejemplo 4

1000 litros de cerveza en fermentación con un contenido de antibiótico de 1500  $\gamma$ /ml se filtraron a pH 3,4. El antibiótico se extrajo del micelio con el doble de su peso de metanol, y se concentró hasta un décimo de su volumen con disolución saturada de bicarbonato de sodio hasta pH = 7, y se mezcló por agitación constante con una disolución de cloruro de calcio (25 ml de disolución saturada de  $\text{CaCl}_2$  por un litro de residuo). La sal de calcio precipitada se filtró, se lavó con agua, después con acetona, y se secó después. Peso de sal de Ca de parvulina: 1620 g (contenido de antibiótico: 50%). Rendimiento: 54%.

#### Ejemplo 5

20 g del complejo de antibiótico aislado y purificado según el Ejemplo 3 se separaron en sus com

ponentes por medio de una cromatografía de adsorción sobre una columna de gel de sílice. La columna se preparó a partir de un kg de gel de sílice (Silica Gel Koch Light Laboratories, Ltd., abertura de malla de 74 a 149 micras).  
5 Se recogieron 200 fracciones, cada una de 360 ml. La elución se empezó con cloroformo que contenía 10% de metanol, y se continuó elevando su contenido de metanol en un 5% cada vez, hasta 50%, en que se terminó la cromatografía. Tratando las fracciones, se obtuvieron 3,9 g de parvulina A, el componente principal, y además 1,6 g de parvulina B y 1,8 g de parvulina C, junto a aproximadamente 4,8 g de una mezcla de parvulina A y B. Rendimiento: 60,5%.

15

#### REIVINDICACIONES

20

Los puntos de invención propia, no nueva, pero no presentada, practicada, ni divulgada en España, que se  
25

11.3.75

presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Introducción, por DIEZ años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

5 1ª.- Un procedimiento de obtención microbiológica de parvulinas, en el que se cultiva *Streptomyces parvulus* var. *parvuli* (depositado en el National Health Institute, Budapest, Hungría, el 31 de octubre de 1967 con el nº 36) en condiciones aerobias en un medio que contiene proteínas complejas, hidratos de carbono y sales minerales, y los antibióticos acumulados se recuperan por extracción.

15 2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que se usan harina de soja, licor de maceración de maíz, harina de nuez o hidrolizado de caseína como fuente de proteínas complejas, glucosa o lactosa como hidratos de carbono, y NaCl ó CaCO<sub>3</sub> como sal inorgánica.

20 3ª.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1ª ó 2ª, en el que la fermentación se efectúa a 24-32°C, preferiblemente a 26-30°C, con un caudal de aire de 0,7 a 1,2 l/l/min., y preferiblemente a 0,8-1,2 l/l/min.

25 4ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en el que el líquido de fermentación se filtra a pH 3,2-3,6 y los antibióticos se ex-

traen del micelio con un disolvente orgánico polar.

5 5ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en el que las parvulinas se dividen en sus componentes respectivos por cromatografía de adsorción sobre una columna de gel de sílice.

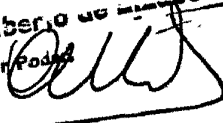
6ª.- Un procedimiento de obtención microbiológica de parvulinas.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

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

15 Madrid, 15 MAR. 1975

P.A.

Alberto de M...  
por poder  


20

25