

16 JUL. 1975

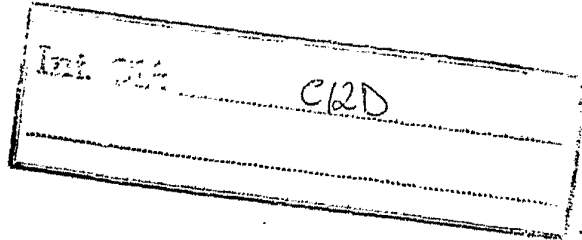
P.- 60.728

HOE 74/F 213

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION



A nombre de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en 6230 Frankfurt/Main 80, República Federal

Alemana

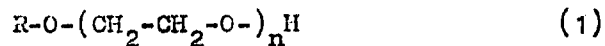
por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE MOENOMICINA"

25.6.75

- 1 -

De acuerdo con la patente alemana federal
 1.210.514 se conoce un procedimiento para la preparación
 de moenomycinina por fermentación microbiológica de estrepto-
 micetos que forman moenomycinina, utilizándose grasas en ca-
 lidad de manantiales de carbono adicionales.

Se ha encontrado ahora un procedimiento para
 la preparación de moenomycinina por fermentación microbioló-
 gica de estreptomycetos que forman moenomycinina de un modo
 biológico usual y en presencia de grasas, el cual procedi-
 miento está caracterizado porque al medio de fermentación
 se le añade un agente tensioactivo no ionógeno de la fórmu-
 la general (1)



en donde R significa un radical hidrocarbonado saturado o
 simplemente insaturado con 8 a 18 átomos de carbono, que
 en cada caso puede llevar también un grupo hidroxilo, y n
 significa un número entero entre 18 y 30.

Los radicales hidrocarbonados R son preferible-
 mente de cadena recta; no obstante, especialmente en el ca-
 so de radicales de origen sintético, pueden contener hasta
 aproximadamente 20% de porciones ramificadas. Especialmen-
 te, se prefieren radicales hidrocarbonados con 10 a 14 áto-
 mos de carbono.

En la fórmula general (I) R significa especial-
 mente octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo,

tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo así como octenilo, nonenilo, decenilo, undecenilo, dodecenilo, tridecenilo, tetradecenilo, pentadecenilo, hexadecenilo, heptadecenilo y octadecenilo. Además, significa

5 hidroxioctilo, hidroxinonilo, hidroxidecilo, hidroxoundecilo, hidroxidodecilo, hidroxitridecilo, hidroxitetradecilo, hidroxipentadecilo hidroxiheptadecilo así como hidroxioctadecilo. El grupo hidroxí puede encontrarse en

10 todos los radicales precedentemente mencionados junto al primero, segundo, tercero, etc, hasta el penúltimo, átomo de carbono: C_1-C_7 en el caso del radical octilo, C_1-C_8 en el caso del radical nonilo, C_1-C_9 en el caso del radical decilo, C_1-C_{10} en el caso del radical undecilo, C_1-C_{11} en el caso del radical dodecilo, $C_1 - C_{12}$ en el caso del radical tridecilo, $C_1 - C_{13}$ en el caso del radical tetradecilo, $C_1 - C_{14}$ en el caso del radical pentadecilo, $C_1 - C_{15}$ en el caso del radical hexadecilo, $C_1 - C_{16}$ en el caso del radical heptadecilo, y $C_1 - C_{17}$ en el caso del radical octadecilo.

15

20 En lo que se refiere a la posición del grupo hidroxí en la molécula se prefieren los compuestos que son asequibles en la práctica del modo más fácil tales como, por ejemplo, ácido 12-hidroxí- Δ -9,10-octadecenoico o ácido 12-hidroxí- Δ -6,7-octadecenoico o ácido 12-hidroxí- Δ -9,10-

25 -tetradecenoico o ácido 12-hidroxí- Δ -5,6-tetradecenoico.

Como radicales hidrocarbonados simplemente insaturados entran en consideración para R Δ -4,5-decenilo, Δ -9,10-decenilo, Δ -4,5-dodecenilo, Δ -5,6-tetradecenilo, Δ -9,10-tetradecenilo, Δ -9,10-hexadecenilo, Δ -6,7-octadecenilo, Δ -9,10-octadecenilo y Δ -11,12-octadecenilo; en todos los radicales hidrocarbonados insaturados precedentemente mencionados puede encontrarse adicionalmente un grupo hidroxilo junto a cada uno de los átomos de carbono que no lleven ningún doble enlace. En este caso todos los radicales hidrocarbonados insaturados mencionados pueden presentarse tanto con configuración cis como también con configuración trans. En este caso se prefieren las configuraciones que se presentan de modo natural. Esto ocurre también con las posiciones de los dobles enlaces.

Entre los agentes tensioactivos de la fórmula general (1) se prefieren en especial aquellos cuyo peso molecular se encuentra entre 1.000 y 1.050, cuyo punto de enturbiamiento (1 g de sustancia en 100 ml de solución al 10% de sal común) se encuentra entre 73 y 79, cuyo índice de hidroxilo se encuentra entre 39 y 78 y cuyo valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo se encuentra entre 16 y 18.

Entre los agentes tensioactivos de la fórmula I especialmente preferidos se han acreditado sobresalientemente aquellos en los cuales por un lado n significa el número 25 y R significa una mezcla de 6-9% de octilo, 5-7%

25.6.75

de decilo, 43-54% de dodecilo, 18-20% de tetradecilo, 7-9% de hexadecilo y 8-10% de octadecilo, en los cuales por otro lado n significa los números 18, 20 ó 22, y R significa do decilo.

5 Los agentes tensioactivos mencionados son preparados mediante oxalcoholación, especialmente oxetilación, de alcoholes grasos adecuados en medio alcalino con diversas cantidades de óxido de etileno.

10 La fermentación de los estreptomicetos se lleva a cabo en condiciones aerobias en un medio acuoso, que, además de sales inorgánicas, contiene en calidad de manantial de carbono almidón, glucosa, azúcar de caña o melaza y adicionalmente una grasa animal, vegetal o sintética, y en calidad de manantial de nitrógeno contiene grano triturado
15 o harina de soja, líquido de maceración de maíz, extracto de levadura, harina de semilla de algodón o harina de em
brión de algodón, nitratos o sales amónicas, así como un agente tensioactivo de la fórmula (1).

20 La fermentación se lleva a cabo hasta alcanzarse una actividad antibiótica máxima. Esta puede ser determinada midiendo la concentración del nitrógeno disuelto en el medio de fermentación o de la masa ponderal seca formada.

25 Después de alcanzarse la máxima actividad antibiótica se interrumpe la fermentación. Para el aislamiento

25.6.75

del antibiótico o bien todo el cultivo se homogeneiza y seguidamente se extrae, o bien el micelio es separado por centrifugación con respecto de la solución de cultivo y estos dos componentes son extraídos cada uno por sí solo. Como
5 agentes de extracción entran en consideración preferiblemente disolventes miscibles con agua o parcialmente miscibles con agua, por ejemplo metanol, etanol, propanol, butanol, etilenglicolmonometiléter, acetona o dioxano.

A partir de los extractos obtenidos de este modo el antibiótico bruto es recuperado convenientemente evaporando el disolvente a presión reducida. El residuo, para la purificación adicional, es extraído con disolventes orgánicos polares calientes, por ejemplo metanol, y el antibiótico es precipitado a partir del extracto concentrado
10 bajo presión reducida por precipitación con un disolvente orgánico moderadamente polar, tal como dietiléter, diisopropiléter o acetato de etilo.
15

Como estreptomicetos formadores de moenomycinina se utilizan *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14.672, *Streptomyces bambergiensis* ATCC 13.879, *Streptomyces ederensis* ATCC
20 15.304 y *Streptomyces geysiriensis* ATCC 15.303, así como sus mutantes y revertantes.

Como grasas animales entran en consideración convenientemente grasas corporales de animales, tales como manteca de cerdo o sebo de carnero, o fracciones preparadas
25
25.6.75

artificialmente de dichas grasas con un contenido definido de carbono. Como grasas vegetales se utilizan convenientemente aceites grasos, tales como aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de coco, aceite de ricino etc. Además entran en consideración grasas sintéticas tales como triglicérido de ácido oléico o triglicérido de ácido esteárico. Todas las grasas son utilizadas en concentraciones entre 0,1 y 16% en peso, preferiblemente de 2 a 5% en peso.

Es sorprendente el efecto extraordinariamente favorecedor o activador de la adición de un agente tensioactivo de la fórmula general (1), efectuada según el invento, sobre la formación de moenomycinina a partir de especies de *Streptomyces*. Ciertamente es conocido el efecto estimulador, por ejemplo, de derivados de polioxietileno de anhídridos de sorbitán que están esterificados parcialmente con un ácido graso (tipos de Tween (R)) o de ésteres de ácidos grasos de azúcar, sobre la producción de enzimas por ciertos microorganismos (E.T. Reese y otros, *Applied Microbiology*, 1969, 242-245) así como sobre la formación de riboflavina a partir de *Ashbya gossypii* (C.G. Smith y otros, *Biochim. Biophys. Acta* 47 (1961) 344-349). No obstante, estos compuestos tensioactivos no tienen ningún efecto positivo sobre la formación de moenomycinina. Por otro lado, los compuestos de la fórmula general () que favorecen la formación

de moenomicina, no tienen ningún efecto positivo, por ejemplo, sobre la formación de estreptomycin.

Ejemplos

5 Streptomyces ghanaensis ATCC 14.672 es sobreinoculado en un matraz Erlenmeyer de 300 ml sobre 30 ml de un medio nutritivo estéril con la siguiente composición:

- 4,0% de glucosa;
 - 3,0% de harina de soja;
 - 0,3% residuos secos de destilación;
 - 10 0,25% de sal común;
 - 0,25% de carbonato de calcio
- agua hasta 30 ml.

Después de inoculación, el cultivo previo es agitado a 28 hasta 30°C durante dos días con una frecuencia de 300 vueltas/minuto.

15

El medio de fermentación del cultivo principal tiene la siguiente composición:

- 3,0% de aceite de soja;
- 3,0% de harina de soja;
- 20 3,0% de fécula de maíz;
- 1,0% de sacarosa;
- 0,3% de sulfato amónico;
- 0,4% de carbonato de calcio;
- 2,0% de levadura;
- 25 agua hasta 30 ml.

La adición al medio de fermentación de uno de los agentes tensioactivos mencionados en la siguiente Tabla 1 se efectúa en forma de una solución acuosa al 10% en peso con agua doblemente destilada. La solución es esterilizada a continuación durante 10 minutos a 123 hasta 127°C.

Luego el medio de fermentación antes mencionado es mezclado con 1,5 ml de la solución de agente tensioactivo a 37°C. Después se añaden 5 ml del cultivo previo.

Este cultivo principal es agitado a 28 hasta 30°C durante 120 horas con 260 a 300 vueltas/minuto.

A continuación el conjunto es agitado en el vibromezclador durante 2 minutos con 60 ml de metanol y seguidamente es filtrado a través de un filtro de pliegues. En una porción alicuota del producto filtrado se determina el contenido de moenomycinina por su acción sobre un cultivo normalizado de *Staphylococcus aureus* por vía turbidimétrica en comparación con el efecto de una solución de moenomycinina con un contenido conocido de la misma.

Los restantes resultados recopilados en la Tabla se obtuvieron por variación de las capas de *Streptomyces*, la adición de grasa y la adición de agente tensioactivo en condiciones por lo demás iguales.

Los agentes tensioactivos indicados en la Tabla tienen los siguientes datos característicos, en donde PM significa peso molecular, PE significa punto de enturbiamien

to, IH significa índice de hidroxilo y EHL significa valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo

| | n | PM | PE | IH | EHL |
|------------|------|------|----|----|------|
| 5 Mezcla A | 20 : | 1070 | 77 | 53 | 16,2 |
| Mezcla A | 25 : | 1290 | 78 | 44 | 16,8 |
| Mezcla B | 25 : | 1260 | 77 | 43 | 17,5 |
| Dodecilo | 20 : | 1000 | 79 | 56 | 16,5 |
| Dodecilo | 30 : | 1430 | 78 | 39 | 17,5 |

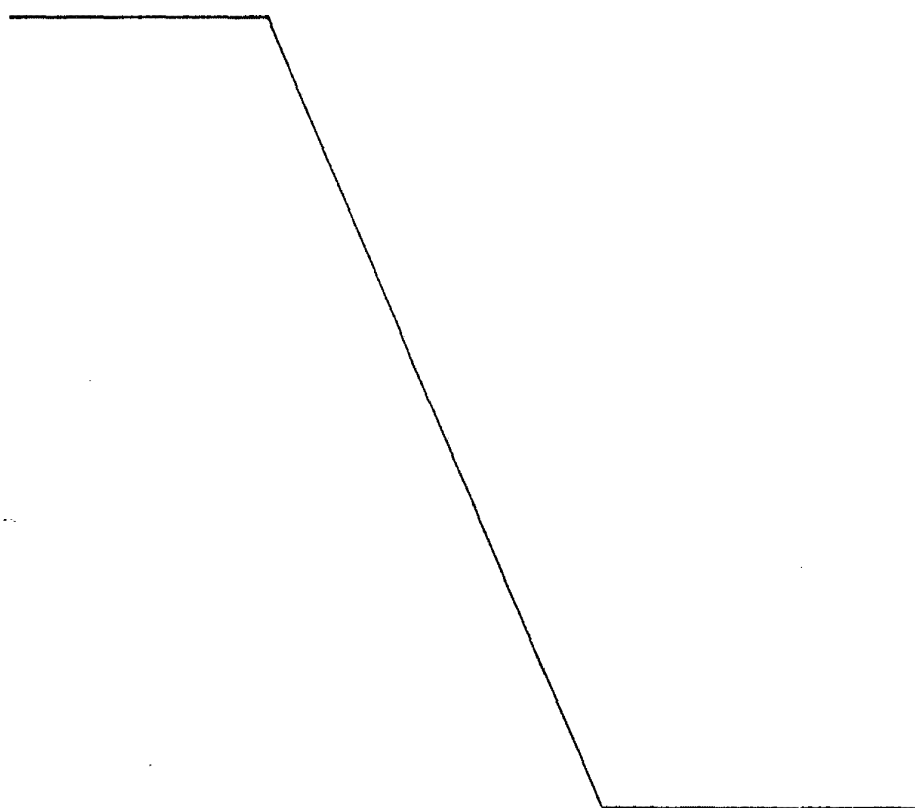
10

15

20

25

25.6.75



Tabla

| | Fermentación con Streptomyces | Grasa | Radical hidro carbonado R | n | Rendimien to de moe nomicina |
|---------|----------------------------------|-------------------|--|----|------------------------------------|
| 5 | Str.bambergiensis | Aceite de soja | - | - | 100% |
| 10 | Str.bambergiensis | Aceite de soja | Mezcla A a ba se de 7 % C ₈ 6 % C ₁₀ 51 % C ₁₂ 19 % C ₁₄ 8 % C ₁₆ 9 % C ₁₈ | 20 | 161 % |
| 15 | Str.bambergiensis | Aceite de soja | mezcla A | 25 | 180 % |
| 20 | Str.bambergiensis | Aceite de soja | mezcla B a ba se de 13 % C ₉ 32 % C ₁₀ 20 % C ₁₁ 10 % C ₁₂ 14 % C ₁₃ 10 % C ₁₄ 3 % C ₁₅ | 25 | 155 % |
| 25 | | | | | |
| 25.6.75 | | | | | |

Tabla (continuación)

| | Fermentación con Streptomyces | Grasa | Radical hidro carbonado R | n | Rendimien to de mog nomicina |
|----|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----|------------------------------------|
| 5 | | | | | |
| | Str.bambergiensis | aceite de coco | dodecilo | 30 | 165 % |
| 10 | Str.bambergiensis | trioleato de gliceri na | mezcla A | 20 | 200 % |
| | Str.bambergiensis | trioleato de gliceri na | dodecilo | 30 | 190 % |
| 15 | Str.bambergiensis | trioleato de gliceri na | dodecilo | 20 | 202 % |
| | Str.bambergiensis | aceite de ricino | mezcla A | 25 | 205 % |
| 20 | Str.ghanaensis | aceite de soja | - | - | 100 % |
| | Str.ghanaensis | aceite de soja | mezcla A | 20 | 158 % |
| 25 | Str.ghanaensis | aceite de coco | dodecilo | 30 | 160 % |

25.6.75

Tabla (continuación)

| | Fermentación con <i>Streptomyces</i> | Grasa | Radical hidro carbonado R | n | Rendimien to de moe nomicina |
|----|---|---------------------------|------------------------------|----|------------------------------------|
| 5 | <i>Str.ghanaensis</i> | trioleato de glicerina | mezcla A | 20 | 158 % |
| | <i>Str.ghanaensis</i> | trioleato de glicerina | dodecilo | 30 | 173 % |
| 10 | <i>Str.ghanaensis</i> | trioleato de glicerina | dodecilo | 20 | 158 % |
| | <i>Str.ghanaensis</i> | aceite de ricino | mezcla A | 25 | 150 % |
| 15 | <i>Str.geysiriensis</i> | aceite de soja | - | - | 100 % |
| | <i>Str.geysiriensis</i> | aceite de soja | mezcla A | 20 | 155 % |
| | <i>Str.geysiriensis</i> | aceite de coco | dodecilo | 30 | 150 % |
| 20 | <i>Str.geysiriensis</i> | trioleato de glicerina | mezcla A | 20 | 160 % |
| | <i>Str.geysiriensis</i> | trioleato de glicerina | dodecilo | 30 | 155 % |
| 25 | <i>Str.geysiriensis</i> | trioleato de glicerina | dodecilo | 20 | 160 % |

25.6.75

Tabla (continuación)

| | Fermentación con Streptomyces | Grasa | Radical hidro carbonado R | n | Rendimien to de moe nomicina |
|----|----------------------------------|---------------------------|------------------------------|----|------------------------------------|
| 5 | | | | | |
| | Str.geysiriensis | aceite de ricino | mezcla A | 25 | 145 % |
| 10 | Str.ederensis | aceite de soja | - | - | 100 % |
| | Str.ederensis | aceite de soja | mezcla A | 20 | 152 % |
| | Str.ederensis | aceite de coco | dodecilo | 30 | 140 % |
| 15 | Str.ederensis | trioleato de glicerina | mezcla A | 20 | 145 % |
| | Str.ederensis | trioleato de glicerina | dodecilo | 30 | 150 % |
| 20 | Str.ederensis | trioleato de glicerina | dodecilo | 20 | 155 % |
| | Str.ederensis | aceite de ricino | mezcla A | 25 | 140 % |

Esta solicitud que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, el día 23 de Julio de 1974, bajo el Nº P 24 35 260.1, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

REIVINDICACIONES

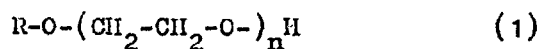
10

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:

15

20

1ª.- Procedimiento para la preparación de moenomina por fermentación microbiológica de estreptomicetos que forman moenomina por vía biológica usual y en presencia de grasas, caracterizado porque al medio de fermentación se le añade un agente tensioactivo de la fórmula general (1)



25

en donde R significa un radical hidrocarbonado saturado o

25.6.75

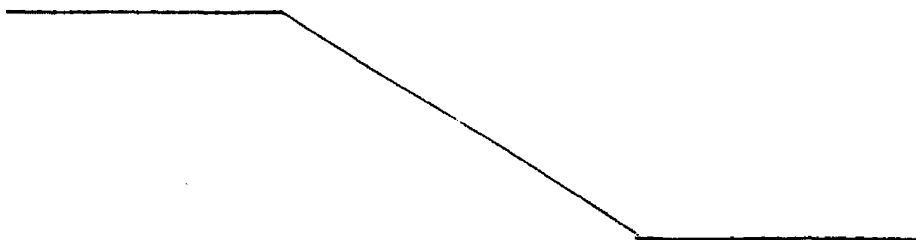
simplemente insaturado con 8 a 18 átomos de carbono, que en cada caso puede llevar también un grupo hidroxilo, y n significa un número entero entre 18 y 30.

5 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque en calidad de estreptomicetos formadores de moenomocina se utilizan *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14.672, *Streptomyces bambergiensis* ATCC 13.879, *Streptomyces ederensis* ATCC 15.304 o *Streptomyces geysiriensis* ATCC 15.303 así como sus mutantes y revertantes.

10 3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque en calidad de agente tensioactivo de la fórmula general (1) se utiliza uno cuyo peso molecular se encuentra entre 1.000 y 1.500 , cuyo punto de enturbiamiento se encuentra entre 73 y 79, cuyo índice de hidroxilo se encuentra entre 39 y 78, y cuyo valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo se encuentra entre 16 y 18.

15 4ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE MOENOMICINA.

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



25
25.6.75

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

Madrid,

16 JUL. 1975

P.A.

5

Alberto de Ezpeleta
For Poder

10

15

20

25

25.6.75

J.E.P.