

30 JUL 1976

439841

P.- 60.965

2 339 72

13	CASE 5599 A
C.L.D.	

MEMORIA DESCRIPTIVA

CONCEDIDA

para solicitar PATENTE DE INVENCION

23 OCT. 1976

a nombre de PFIZER INC.

entidad norteamericana

establecida en 235 East 42nd Street, Nueva York, Nueva York, Estados Unidos de América.

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR EL COMPUESTO 38295 ANTIBIOTICO"

Prioridades reivindicadas: Estados Unidos de América, 9 de Agosto de 1.974 Nº 496.289 y 17 de Marzo de 1.975 Nº 558.785.

Esta invención está relacionada con un nuevo miembro del grupo de antibióticos de éter policíclico ácido, que es una clase de compuestos que están biológicamente caracterizados por su efecto en el transporte de cationes en mitocondria. Esta familia de antibióticos incluye la monensina (Diario de la Sociedad Americana Química, 89:5737, 1967); nigericina (Comunicación de Investigación Bioquímica y Biofísica, 33:29, 1968); grisorixina (Comunicación Química del Diario de la Sociedad Química, 1421, 1970); dianemicina (Diario de Antibióticos, 22:161, 1969); salinomicina (Diario de Antibióticos, 27:814, 1974); X-537A (Comunicación Química del Diario de la Sociedad Química, 967, 1972); X-206 (Comunicación Química del Diario de la Sociedad Química, 927, 1971); y A204A (Diario de la Sociedad Americana Química, 95:3399, 1973).

Los antibióticos de éter policíclico enumerados en lo que antecede, son reactivos contra bacterias Gram-positiva, hongos, y protozoarios. Exhiben actividad anticoccidial potente.

en un medio nutritivo acuoso. El antibiótico y sus sales catiónicas, son agentes antimicrobianos y potentes y son co-cidiostatos efectivos y activadores del crecimiento en los animales.

El microorganismo útil para la preparación del antibiótico de esta invención, se aisló de una muestra de tierra de Japón. Se hizo crecer en un número de medios que se usaron para la identificación de este género y se llegó a la conclusión de que era bastante semejante a la descripción del Streptomyces hygrosopicus.

El cultivo (Pfizer F.D. 23604) se comparó de acuerdo con un número de particularidades en varios medios con un cultivo de Streptomyces hygrosopicus 482.48 obtenido de la Colección de Cultivo Pública Holandesa (CBS) Centraalbureau voor Schimmelcultures. Se hicieron comparaciones y decisiones sobre la base del concepto de la especie tal y como se describe en Microbiología Aplicada 4:243-250, 1956. A continuación se da una comparación de los dos cultivos:

Morfología de Cadena de Espora - las cadenas de Pfizer F. D. 23604 en espirales de 6 a 10 vueltas o menos en medios diferentes, se asemejaron a las cadenas descritas del Streptomyces hygrosopicus CBS que se ilustra en la Figura 1 del documento al cual se hace referencia en lo que antecede. Las esporas de Pfizer F.D. 23604 que se examinaron bajo un microscopio electrónico de exploración, tenían exactamente

la apariencia de aquellas de la cepa CBS de Hygroscopicus que se ilustra en la Microbiología Aplicada, 18:695-696; de 1969, en donde las esporas se describen como teniendo una superficie rugosa que consiste de picaduras numerosas rodeadas por rebordes del material de pared de esporas. Las platinas con esporas de los dos cultivos tenían apariencia idéntica.

Color de la Colonia - el micelio aéreo tenía apariencia gris en la mayoría de los medios, pero el tono exacto era algo diferente para los dos cultivos. El Pfizer F.D. 23604 en agar de sucrosa de Czapek, tenía un crecimiento blanco grisáceo grueso, doblado irregularmente, mientras que la cepa CBS de S. hygroscopicus era plana, delgada y gris. El Pfizer F.D. 23604 en agar de harina de avena, después de cuatro semanas de incubación desarrollaron un tono amarillo en el micelio aéreo anteriormente gris. En agar de extracto de malta y extracto de levadura el Pfizer F.D. 23604 tenía manchas amarillas de crecimiento en el micelio gris.

Formación de Melanina - no se produjo melanina mediante cualquier cultivo en el agar de peptona y hierro.

Utilización de carbono - (método de Pridham y Gottlieb, Diario de Bacteriología 56:107-114, 1948), el Pfizer F.D. 23604 utilizó glucosa, L-arabinosa, dextrina, D-fructosa, D(+) galactosa, glicerol, inositol, inulina, lactosa, maltosa, D-mannitol, rafinosa sálica, ramosa, acetato de sodio, D-

sorbitol, sorbosa, almidón, sucrosa, trehalosa y D-xilosa; el dulcitol no se utilizó. Estos resultados son compatibles con aquellos dados a conocer para las cepas de S. hygroscopicus en la Microbiología Aplicada, 15:637-639, 1967, y la cepa CBS de S. hygroscopicus dada a conocer en Microbiología Industrial, 10:183-221, 1969 con la excepción de que la cepa CBS no utilizó inositol.

Producción de H₂S - se obtuvo un resultado positivo para ambos cultivos en tubos inclinados de agar de peptona y hierro, con tiras de acetato de plomo.

Leche - se obtuvieron resultados semejantes para ambos cultivos; ninguna coagulación, hidrólisis completa o casi completa en 12 días; pigmento soluble color canela.

Gelatina - los cultivos eran semejantes en crecimiento, color y régimen de licuefacción moderado.

Características Especiales - la cepa CBS de S. hygroscopicus desarrolló áreas higroscópicas negras en tres semanas en agar de glucosa-asparagina, agar de harina de avena, y agar de extracto de levadura-extracto de malta, mientras que el Pfizer F.D. 23604 mostró manchas negras solamente en agar del extracto de levadura y extracto de malta. La incubación adicional durante una semana y el almacenamiento de algunos cultivos en placas de Petri, a temperatura de 4° a 10° C., durante una cuarta semana, aumentaron en obscurecimiento del Pfizer F.D. 23604. En agar de harina de avena, agar de sucrosa

de Czapek y extracto de levadura y extracto de malta, el Pfizer F.D. 23604 produjo un olor semejante a la cebolla silvestre o al ajo con cierto olor a tierra, mientras que el S. hygrosopicus CBS produjo solamente el olor a tierra y esta especie no se describe en ningún otro sitio como teniendo un olor de cebolla silvestre. La cepa de Pfizer F.D. 23604 de S. hygrosopicus, produce el Compuesto 38295, un nuevo antibiótico de éter policíclico, mientras que el S. hygrosopicus CBS no lo hace, ni tampoco se ha dado a conocer la producción de este antibiótico para otras cepas de S. hygrosopicus.

Este cultivo (F.D. 23604) se ha depositado en La Colección de Cultivo de Tipo Americano, en Rockville, Md., y se designa en la colección como CCTA 31050.

El cultivo de Streptomyces hygrosopicus CCTA 31050 de preferencia se efectúa en medios nutritivos acuosos a una temperatura de 28° a 36° C., y bajo condiciones aeróbicas sumergidas, con agitación. Los medios nutritivos que son útiles para dichos objetos, incluyen una fuente de carbono asimilable, tal como azúcares, almidones y glicerol; una fuente de nitrógeno orgánico tal como caseína, material de digestión enzimático de caseína, harina de frijol de soya, harina de semilla de algodón, harina de cacahuete, gluten de trigo, harina de soya, harina de carne y harina de pescado. Una fuente de sustancias de crecimiento tal y como materiales solubles de grano y extracto de levadura tales como sales, por ejemplo

cloruro de sodio y carbonato de calcio y elementos de traza, tales como hierro, magnesio, zinc, cobalto y manganeso pueden utilizarse asimismo con resultados ventajosos. Si se encuentra una formación de espuma excesiva durante la fermentación, pueden añadirse al medio de fermentación, agentes antiespumantes tales como aceites vegetales o siliconas. La aereación del medio en tanques para el crecimiento sumergido, se mantiene de preferencia 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, generalmente conocidos para aquellas personas expertas en la industria de la fermentación. Deben mantenerse desde luego condiciones asépticas, a través de la transferencia del organismo y a través de su crecimiento.

El inóculo para la preparación del antibiótico puede obtenerse empleando el crecimiento de un tubo inclinado de cultivo. El crecimiento puede usarse para inocular ya sea matraces de agitación o tanques de inóculo, o alternativamente, los tanques de inóculo pueden contaminarse de los matraces de agitación. El crecimiento en matraces de agitación por lo general, habrá llegado a su máximo en de 3 a 5 días, mientras que el inóculo en tanques de inóculo sumergidos, usualmente se efectuará en el período más favorable de 2 a 3 días. Se obtiene una actividad antibiótica considerable en la etapa final del fermentador, en aproximadamente 3 a 5 días. Los nive-

les del antibiótico varían de 50 a 500 miligramos por litro.

El procedimiento de la producción antibiótica, convenientemente es seguido durante la fermentación mediante ensayo biológico del caldo, empleando una cepa sensible de Staphylococcus aureus o Bacillus subtilis. Se emplea la técnica de 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 del antibiótico.

La cromatografía de capa delgada empleando gel de sílice es una herramienta útil para analizar el antibiótico producido en el medio de fermentación y la composición de los materiales crudo y purificado extraídos de los caldos de fermentación. Los cromatogramas de capa delgada, después de desarrollarse con acetato de etilo, se rocían con 3 por ciento de vainillina en ácido sulfúrico etanólico (98.5:1.5 por ciento en volumen/volumen) seguido por calentamiento a temperatura de 60° a 80° C., durante unos cuantos minutos. El antibiótico se observa como una mancha brillante, de color rosado a rojo sobre un fondo blanco.

El compuesto antibiótico 38295 puede separarse y recuperarse del caldo de fermentación clarificado, extrayéndose con un solvente orgánico tal como cloroformo, acetato de etilo o cetona de metilisobutilo. La porción predominante del antibiótico se encuentra en el micelio separado y se extrae convenientemente del mismo, formando una suspensión espesa del

micelio en un solvente soluble en agua tal como metanol.

El método de separación y recuperación preferido del compuesto antibiótico 38,295 es el siguiente:

El caldo de fermentación entero (no filtrado) se extrae dos veces, con de aproximadamente 1/5 a 1/2 volúmenes de acetona de metilisobutilo. El extracto solvente se concentra al vacío hasta formar un residuo aceitoso que luego se forma en una suspensión espesa en cloroformo:hexano (1:1) y se añade a la columna de gel de sílice (de preferencia un lecho de gel de sílice 60 cubierto con una capa de gel de sílice PF₂₅₄, ambos de los cuales pueden obtenerse de E. Merck, Darmstadt, Alemania). La columna de gel de sílice se desarrolla sucesivamente con hexano, cloroformo:hexano (1:1) y cloroformo. La fracción antibiótica principal se eluye con acetato de etilo. El eluato se concentra al vacío, se absorbe en acetona y se filtra durante de aproximadamente 30 a 60 minutos, con carbón vegetal activado (Darco G 60). El carbón vegetal se remueve mediante filtración, la solución se concentra hasta un pequeño volumen al vacío, se añade una cantidad pequeña de agua y el pH se ajusta con hidróxido de sodio hasta un valor de 8.0 a 8.5. El material cristalino que se separa se remueve mediante filtración, se lava con agua y se seca.

El antibiótico que se aísla en esta etapa es una sal mezclada de sodio y de potasio del Compuesto 38295 que se forma tanto con iones de sodio y de potasio que están presentes y

que se depuran del caldo de fermentación y el hidróxido de sodio añadido. Los cromatogramas de capa delgada de este material pueden dar a conocer cantidades con traza de por lo menos dos o más antibióticos polares, que al igual que el compuesto 38295, proporcionan una mancha característica color rosado a rojo al rociarse con la vainillina en ácido sulfúrico etanólico.

El Compuesto 38295, puede obtenerse como una sola entidad mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice PF₂₅₄ que se prepara de hexano. Las sales de sodio y potasio mezclada se añaden como una solución en acetato de etilo o cloroformo y la columna se desarrolla bajo presión de 5.625 kilogramos por centímetro cuadrado, con hexano que contiene cantidades aumentadas de acetato de etilo. El avance de la separación es seguido por cromatografía de capa delgada. Las fracciones apropiadas se combinan, se evaporan al vacío y el antibiótico se cristaliza de acetona y agua.

El ácido libre del Compuesto 38295 puede derivarse de la sal de sodio/potasio mezclada, ajustándose el pH de una solución de acetato de etilo ó cloroformo hasta un valor de 4.5 con ácido fosfórico diluido. La capa orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora al vacío y el residuo se cristaliza de cloroformo y hexano.

La sal de sodio del Compuesto 38295 puede obtenerse ajustando una solución de acetato de etilo o cloroformo del ácido libre hasta un pH de 8.5 con hidróxido de sodio (concen-

tración 1N). El material se cristaliza de acetona y agua. La sal de potasio cristalina se obtiene de manera semejante, usando hidróxido de potasio en vez de NaOH.

Puede prepararse una sal de plata cristalina, mediante la adición de nitrato de plata acuosa, a una solución estandarizada de la sal mezclada de sodio/potasio del Compuesto 38295. Otros compuestos fácilmente obtenibles son las sales de cobre, zinc, amonio, calcio, magnesio y litio del Compuesto 38295.

Debido a su uso final para la prevención y tratamiento de coccidiosis en las aves de corral, el caldo de fermentación entero contiene compuestos 38295 que puede absorberse hasta sequedad (de preferencia mediante secado por rociadura), e incorporarse en el alimento para aves de corral, al nivel de potencia de antibiótico deseado.

El Compuesto 38295 exhibe acción inhibitoria contra el crecimiento de un número de microorganismos (Cuadro I). El organismo de prueba se inocula en una serie de tubos de prueba, que contienen un medio nutritivo y varias concentraciones del Compuesto 38295 para determinar la concentración mínima del antibiótico en microgramos por mililitro, que inhibe el crecimiento del organismo a través de un período de 24 horas.

CUADRO I

<u>Organismo</u>	<u>Compuesto 38295 (sal mezclada - de Na/K)</u>	<u>Compuesto 38295 (áci- do libre)</u>
<u>Staph. aureus</u> 01A005	0.78	0.39
01A052	0.78	3.12
01A109	0.78	0.78
01A110	0.39	1.56
01A400	0.39	1.56
<u>Strep. faecalis</u>	0.20	1.56
<u>Strep. pyogenes</u>	< 0.10	< 0.10
<u>Neisseria sicca</u>	< 0.10	< 0.10
<u>Bacillus subtilis</u>	< 0.10	< 0.10
<u>Lactobacillus casei var casei</u>	1.56	—
<u>Lactobacillus catenaforme</u>	0.78	—
<u>Clostridium innocuum</u>	0.20	—
<u>Clostridium bifermentans</u>	0.78	—
<u>Treponema hyodysenteriae</u>	0.39	—

El Compuesto 38295 y sus sales exhiben actividad excelente contra infecciones de coccidiosis en las aves de corral. Cuando se incorporan en la dieta de los pollos a nivel de 15 a 250 partes por millón, los compuestos son eficaces para controlar las infecciones individuales de Eimeria tenella, E. acervulina, E. maxima, etc., y las infecciones mezcladas de estos organismos.

Los datos de la eficacia para el Compuesto 38295

y sus sales contra infecciones de coccidiosis en los pollos, se obtienen de la siguiente manera. Los Grupos de 3 a 5 pollos cockerel leghorn blancos SPF de diez días de nacidos, se alimentan con una dieta que contiene el Compuesto 38295, o una de sus sales dispersa uniformemente en la misma. Después de estar a esta ración durante aproximadamente 24 horas, cada pollo se inocula per os con oocistos de la especie específica de Eimeria que se está probando. Otros grupos de pollos alimentados en una dieta exenta del antibiótico se infectan de manera semejante como controles infectados. Los pollos no infectados, no medicados sirven como controles normales. Los resultados del tratamiento se evalúan después de 5 días en el caso de E. acervulina y 6 días para todas las especies de Eimeria.

El Cuadro II ilustra los resultados que se obtienen con la sal mezclada de sodio y de potasio del Compuesto 38295.

CUADRO II

<u>Especie de Infección</u>	<u>Dosis (ppm)</u>	<u>Grado de infección promedio*</u>	<u>Proporción*</u>
Eimeria tenella	250	0.0	0.0
	125	0.0	0.0
	60	0.7	0.21
	30	1.7	0.54
	15	2.7	0.86

CUADRO II (continuación)

<u>Especie de Infección</u>	<u>Dosis (ppm)</u>	<u>Grado de infección promedio*</u>	<u>Proporción*</u>
<u>Eimeria acervulina</u>	250	0.0	0.0
	125	0.2	0.1
	60	0.0	0.0
	45	0.4	0.2
	30	1.2	0.6
	15	2.0	1.0
<u>Eimeria necatrix</u>	250	0.0	0.0
	125	0.2	0.13
	60	0.2	0.13
<u>Eimeria maxima</u>	250	0.0	0.0
	125	0.0	0.0
	60	0.4	0.25
	45	0.6	0.33
	30	0.8	0.44
	15	1.8	0.66
<u>Eimeria brunetti</u>	250	0.4	0.22
	125	0.4	0.22
	60	0.8	0.44
	45	1.2	0.66
	30	1.6	0.88
	15	1.6	0.88

CUADRO II (continuación)

<u>Especie de Infección</u>	<u>Dosis (ppm)</u>	<u>Grado de infección promedio*</u>	<u>Proporción**</u>
Infección Mezclada (Coccivac D, Sterwine Laboratories, Opelika, Alabama)	250	0.0, 0.0**	0.0, 0.0
	125	0.2, 0.4	0.08, 0.18
	60	0.2, 0.0	0.08, 0.10
	50	1.0, 0.6	0.38, 0.21
	40	1.2, 1.0	0.46, 0.35
	30	2.6, 2.0	0.85, 0.71

*Los criterios usados para medir la actividad anticoccidial, consiste de resultados de lesiones de 0, a 4 para E. Tenella (J.E. Lynch, Diario Americano de Investigación Veterinaria, 22:324-326, 1961) y de 0 a 3 para otras especies (J. Johnson y W.H. Reid, Parasitología Experimental, 28:30-36, 1970). Se establece una proporción constante dividiendo el resultado de las lesiones de cada grupo tratado entre el resultado de las lesiones del control infectado.

**El primer número se relaciona con lesiones intestinales y el segundo número con lesiones cecales.

Pueden obtenerse resultados semejantes con el ácido libre, la sal de sodio, la sal de potasio o un medio de fermentación seco que contiene el Compuesto 38295 en la relación al nivel de potencia de antibiótico deseado.

Las propiedades activadoras de crecimiento del Compuesto 38295, se ilustran mediante las siguientes pruebas con ganado vacuno.

Se asignan al azar en establos, becerros Angus heifer, 5 becerros por establo, y se administran oralmente con el Compuesto 38295 mediante bolas grandes, en el agua potable, etc. Sin embargo el compuesto se administra ventajosa y rápidamente sobre una base de actividad, incorporándose en las composiciones de alimento de alto contenido de forraje a niveles de 11 a 33 partes por millón. El compuesto 38295 puede estar en varias formas como el ácido libre, la sal de sodio, la sal de potasio, las sales mezcladas de sodio y potasio o un caldo de fermentación seco producido mediante Streptomyces hygroscopicus CCTA 31050.

Las composiciones de alimento no medicadas y con el Compuesto 38295, se administran a los animales de prueba ad libitum. La composición del alimento es una ración final para ganado vacuno de 12.5 por ciento de proteína y 75:25 concentrado:forraje, que contiene maíz, harina de frijol de soya, harina de alfalfa, fosfato de calcio, melaza, vitaminas y minerales de traza. El compuesto 38295, se incluye en una premezcla junto con maíz molido, minerales y vitaminas.

RACION BASICA

Ración final para ganado vacuno de 12.5% de Proteína - 75:25
(Concentrado:Forraje)

<u>Ingrediente</u>	<u>Porcentaje</u>
Maíz Amarillo Molido	55.6
Harina de Frijol de Soya, 48% de proteína	6.3
Harina de Alfalfa, 17% de proteína	25.0
Melaza Seca*	10.0
Aceite de Frijol de Soya	2.0
Fosfato de dicalcio (24% de Ca, 18.5% de P)	0.40
Sal mineral de traza**	0.50
Premezola de vitamina-minerales***	0.20

*Melaza de caña de azúcar sobre un portador de la fracción de mazorca de maíz: no menos de 3 por ciento de proteína cruda y no más de 15 por ciento de fibra, no menos de 42 por ciento de azúcar inerte, máximo 6 por ciento de agua.

** Aportó los siguientes niveles de minerales de traza en partes por millón: manganeso 10; hierro 6.25; cobre 1.25; yodo 0.025; cobalto 0.86; zinc 45.

*** Aportó los siguientes niveles de vitaminas por 0.454 kilogramos de ración: vitamina A 1497 I.U.; Vitamina D 200 I.U.; vitamina E 25, I.U.

PREMEZCLA

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad (1.815 Kg.)</u>
Complemento de Vitamina A (30,000 UI por gramo)	.099 Kg.
Complemento de Vitamina D ₃ (200,000 UI por gramo)	2.00 gm.
Complemento de Vitamina (125,000 UI por 0.454 kilogramos)	.182 Kg.
Oxido de Zinc (79.4 por ciento de zinc)	38.0 gm.
Carbonato Cobaltoso (45% de cobalto)	1.70 gm.
Maiz molido finamente o pasado a través de un molino de soya	1.48 Kg.
Compuesto 38,295	40.0 gm.

Una cantidad de 0.454 kilogramos de la premezcla, por tonelada de la ración completa proporciona un nivel final del Compuesto 38,295 de 11 partes por millón.

El Cuadro II ilustra los resultados de una prueba de 28 días que se obtienen con tres establos duplicados de cinco becerras por establo de peso inicial aproximado de 181.600 kilogramos por becerro.

CUADRO III

(sales mezcladas de sodio y de potasio del Compuesto 38,295)

Tratamiento (partes por millón)	ADP*		ADP**		Alimento/ Aumento***	
	kgs.	Indice	Kgs.	Indice	Propor ción	Indi ce
Control	.940	100.0	6.45	100.0	6.95	100.0
Compuesto 38,295 (11)	1.04	110.6	6.13	95.1	5.94	117.0
Compuesto 38,295 (33)	1.10	116.9	5.63	87.3	5.11	136.0

* aumento diario promedio

** alimentación diaria promedio

*** kilogramos de alimento por kilogramo de aumento

Pueden obtenerse virtualmente los mismos resultados con el ácido libre, la sal de sodio, la sal de potasio o el caldo de fermentación seco que contiene el compuesto 38,295.

Pueden obtenerse resultados comparables con otros rumiantes tales como la oveja o los animales monogástricos tales como caballos, cerdos y conejos.

El Compuesto 38,295 activo puede administrarse en el alimento de los animales para el agua potable o en una premezcla se usará para incorporarse en el alimento o agua potable del animal. Un concentrado de premezcla de antibiótico líquido apropiado para añadirse al agua potable para aumentar la eficacia del alimento en los animales se puede preparar a las concentraciones deseadas disolviendo el compuesto 38,295 en un solvente apropiado tal como etanol o

propilenglicol.

CONCENTRADO DE PREMEZCLA LIQUIDO

Un concentrado de premezcla antibiótico líquido apropiado para añadirse al agua potable de los animales se puede preparar a las concentraciones deseadas disolviendo el antibiótico que contiene el Compuesto 38,295 en un solvente apropiado tal como etanol o propilenglicol.

EJEMPLO I

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

	<u>Gramos por litro</u>
Glucosa	10.0
Almidón soluble	20.0
Extracto de levadura	5.0
Material de digestión enzimático de caseína	5.0
Harina de carne	5.0
CaCO ₃	1.0

pH - 7.0

Las células de un tubo inclinado de Streptomyces hygroscopicus CCTA 31050 se trasladan a una serie de mat ra-

ces de capacidad de 300 mililitros, cada uno de ellos conteniendo 50 mililitros de este medio estéril y se agitan en un agitador giratorio durante de 3 a 4 días a temperatura de 28 a 30°C. Las alicuótas de cinco mililitros de este inóculo de crecimiento se trasladan asepticamente a matraces de capacidad de 300 mililitros que contienen 100 mililitros del medio estéril tal y como se ha descrito en lo que antecede. Después de agitarse durante 3 a 4 días a temperatura de 28° a 30°C., el inóculo desarrollado se traslada a los aparatos de fermentación de capacidad de cuatro litros que contienen dos litros del siguiente medio estéril:

	<u>Gramos por litro</u>
Glucosa	10.0
Almidón de maíz	10.0
Harina de Soya	10.0
Materiales solubles de grano.	5.0
NaCl	5.0
CaCO ₃	1.0

pH = 5.6

La fermentación se lleva a cabo durante de 90 a 120 horas a temperatura de 28° a 36°C. con agitación a 1700 revoluciones por minuto y aereación a aproximadamente un volumen de aire por volumen de caldo por minuto. Los aparatos de fermentación grandes que contienen de 302.800 a 37,850 litros del medio se pueden inocular hasta aproximadamente 2 por ciento de este medio de crecimiento. La fermentación se lleva

a cabo hasta que se obtiene una potencia de antibiótico de por lo menos 50 miligramos por litro (de 90 a 120 horas).

Cien litros del caldo de fermentación no filtrado entero, se extraen dos veces con una quinta parte del volumen de cetona de metilisobutilo. El extracto del solvente separado se concentra al vacío hasta formar un residuo aceitoso (769 gramos) que se dispersa en gel de sílice mediante su adición en solución en 2 litros de cloroformo a 1 kilogramo de gel de sílice PF₂₅₄, seguido por la remoción del solvente al vacío. El residuo resultante se forma en una suspensión espesa en 2 litros de cloroformo:hexano (1:1) y se añade a un lecho de 300 gramos de gel de sílice 60 sobre el cual se coloca una capa de 300 gramos de gel de sílice PF₂₅₄. El gel de sílice luego se lava sucesivamente con 7.570 litros de hexano, 7.570 litros de cloroformo:hexano (1:1) y 7.570 litros de cloroformo. El antibiótico se eluye con 3.785 litros de acetato de etilo. El acetato de etilo se remueve al vacío y el residuo (38 gramos) se disuelve en 400 mililitros de acetona. La solución de acetona se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 45 minutos con aproximadamente 40 gramos de carbón vegetal activado (Darco G 60). La filtración es seguida mediante concentración hasta aproximadamente 200 mililitros y la dilución con 100 mililitros de agua. El Compuesto 38295 se separa como una sal mezclada de sodio/potasio al ajustarse el pH a un va-

lor de 8.5 con NaOH de concentración 1.0N. El material cristalino (13.8 gramos) se disuelve en acetato de etilo y se cromatografía en una columna de gel de sílice FF₂₅₄ preparado en hexano. La columna se desarrolla bajo presión de 5.625 kilogramos por centímetro cuadrado con hexano que contiene cantidades aumentadas de acetato de etilo. El avance de la separación es seguido por cromatografía de capa delgada. Las fracciones apropiadas se combinan, se evaporan al vacío y el compuesto puro se cristaliza de acetona y agua.

La sal mezclada de sodio/potasio pura cristalina del Compuesto 38295 tiene una temperatura de fusión de 200°C. y una rotación óptica de $\alpha_D^{25} = +36^\circ$ a concentración de 1 por ciento en metanol. Después de secarse al vacío durante la noche a temperatura a 70°C. sobre pentóxido de fósforo, el análisis promedio para el carbono es de 60.58 por ciento y para el hidrógeno es el 8.56 por ciento.

El compuesto soluble en metanol, etanol, acetona, cloroformo, cloruro de metileno, éter de dietilo, acetato de etilo, y cetona de metilisobutilo; es parcialmente soluble en hexano y es insoluble en agua.

La sal mezclada e sodio/potasio del Compuesto 38295 no posee patrón característico de absorción de luz ultravioleta.

El espectro infrarrojo de la sal mezclada de sodio/

potasio, Figura 1, se anexa. Un gránulo de KBr muestra absorción característica en la región infrarroja de las siguientes longitudes de onda en micrones: 2.92, 3.40, 6.27, 6.85, 7.22, 8.40, 9.00, 9.15, 9.25, 9.48, 9.98, 10.45, 10.68 y 11.45.

EJEMPLO II

Puede repetirse el método del Ejemplo I empleando caldo de fermentación clarificado en vez del caldo de fermentación no filtrado entero.

EJEMPLO III

El micelio separado del caldo de fermentación clarificado del Ejemplo II se forma en una suspensión espesa varias veces con metanol, el extracto de metanol se concentra al vacío y el residuo se trata mediante el método del Ejemplo I.

EJEMPLO IV

El procedimiento de fermentación del método del Ejemplo I se repite empleando un medio de fermentación de la siguiente composición:

	<u>Gramos por litro</u>
Glucosa	20.0
Almidón de maíz	10.0
Harina de soya	10.0
Materiales solubles de grano	5.0
$Fe_2(SO_4)_3$	0.2
$MnCl_2$	0.2
$CaCO_3$	1.0
NaCl	5.0
Oleato de metilo	2.0
Aceite de frijol de soya	2.0

pH 6.6 a 6.7

Al final del ciclo de fermentación, el caldo de fermentación entero no filtrado que se hace completamente mediante secado por rociadura.

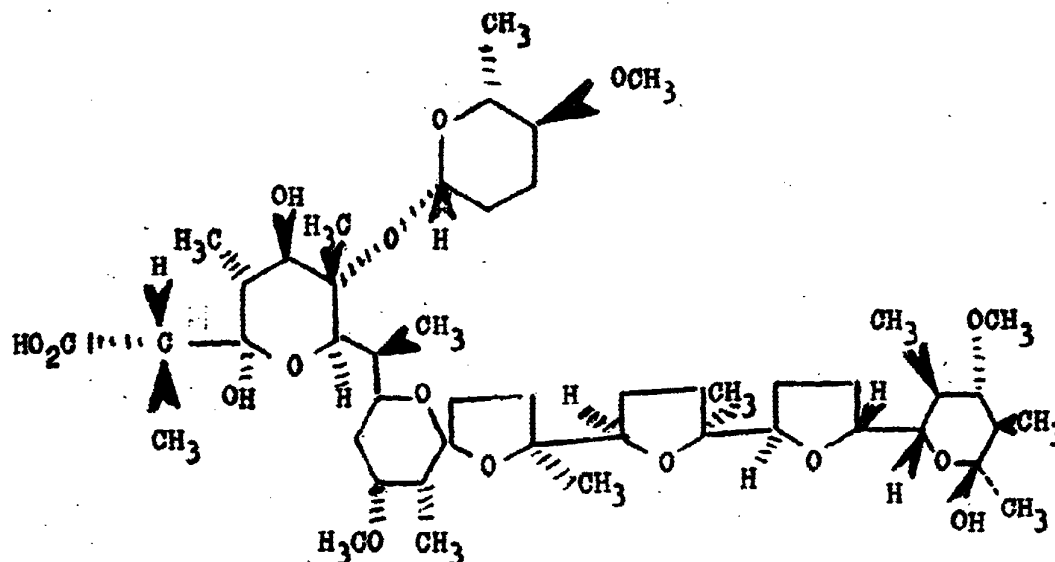
EJEMPLO V

La sal mezclada de sodio/potasio del Compuesto 38295 se disuelve en acetato de etilo y el pH se ajusta a un valor de 4.5 con ácido fosfórico diluido. La capa solvente se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se evapora al vacío y el residuo se cristaliza de cloroformo y hexano para rendir el ácido cristalino que tiene una temperatura de fusión de 135° a 138°C. y una rotación óptica de -

$[\alpha]_D^{25} = +38^\circ$ a concentración de 1 por ciento en metanol. Después de secarse durante la noche al vacío a temperatura de 70°C . sobre pentóxido de fósforo, la composición promedio en peso es de 61.65 por ciento de carbono, 8.94 por ciento de hidrógeno y 29.41 por ciento de oxígeno (mediante diferencia). El ácido libre del Compuesto 38295 no posee patrón característico de absorción de luz ultravioleta.

El espectro infrarrojo del ácido libre del Compuesto 38295, Figura 2, se anexa. Un grano de KBr muestra absorción característica en la región infrarroja a las siguientes longitudes de onda en micrones: 2.92, 3.43, 5.74, 6.85, 7.25, 7.53, 8.28, 8.60, 8.80, 9.00, 9.15, 9.80, 10.10, 10.45, 10.68, 10.92 y 11.13.

El análisis de cristal rayos X de la sal de plata del compuesto 38295 estableció la fórmula estructural de la siguiente representación:



EJEMPLO VI

La sal de sodio del Compuesto 38295 se obtiene mediante la adición de NaOH de concentración 1.0N hasta un pH de 8.5 a una solución de acetato de etilo del ácido libre del Ejemplo V. El material cristalizado de acetona y agua tiene una temperatura de fusión de 197° a 198°C. y una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} = +38^\circ$ a una concentración de 1.03 por ciento en metanol. Después de secarse al vacío durante la noche a temperatura de 70°C. sobre pentóxido de fósforo, la sal de sodio tiene un análisis de 60.28 por ciento de carbono y 8.76 por ciento de hidrógeno.

El espectro infrarrojo de la sal de sodio del Compuesto 38295, Figura 3, se anexa. Un gránulo de KBr muestra

absorción característica en la región infrarroja a las siguientes longitudes de onda en micrones: 2.94, 3.40, 6.25, 6.85, 7.20, 7.45, 8.38, 9.00, 9.27, 9.48, 10.00, 10.45, 10.65, 10.90, 11.13 y 11.47.

EJEMPLO VII

La sal de potasio del Compuesto 38295 se prepara mediante el método del Ejemplo VI empleando hidróxido de potasio en vez de hidróxido de sodio. El material cristalizado de acetona y agua tiene una temperatura de fusión de 196 a 198°C. y una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} = +38^\circ$ a una concentración de 1.02 por ciento en metanol. Después de secarse al vacío durante la noche a temperatura de 70°C. sobre pentóxido de fósforo, el compuesto tiene un análisis de 60.58 por ciento de carbono y 8.70 por ciento de hidrógeno.

El espectro infrarrojo de la sal de potasio del Compuesto 38295, Figura 4, se anexa. Un gránulo de KBr muestra absorción característica en la región infrarroja a las siguientes longitudes de onda en micrones: 2.94, 3.42, 6.27, 6.84, 7.20, 8.75, 9.00, 9.14, 9.30, 9.45, 10.45, 10.92, 11.15 y 11.47.

EJEMPLO VIII

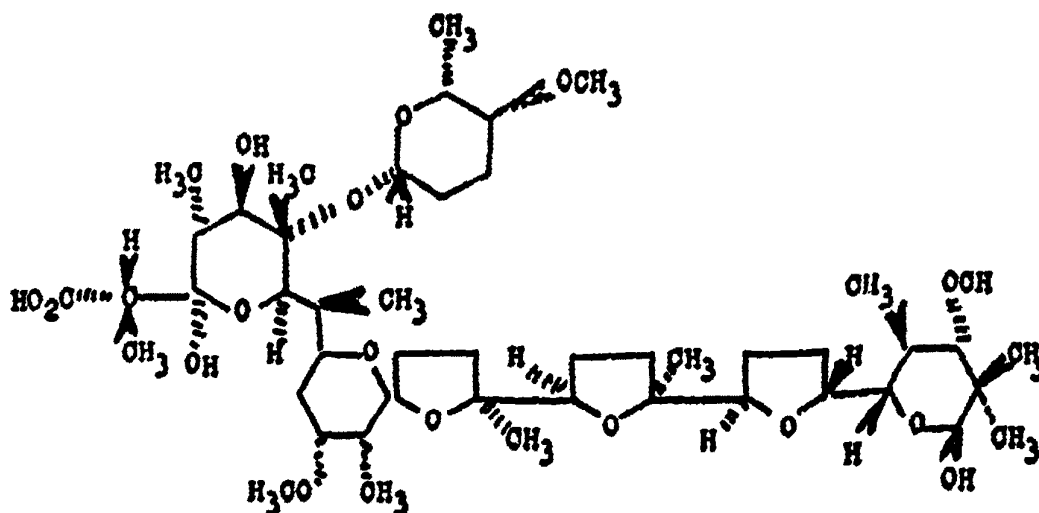
La sal de plata del Compuesto 38295 se prepara

mediante la adición de nitrato de plata acuoso a una solución etanólica de la sal mezclada de sodio/potasio del Ejemplo I. El sólido que se separa se cristaliza de metanol. Tiene una temperatura de fusión de 198° a 200°C. y una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} = +27^\circ$ a una concentración de 0.982 por ciento en metanol. La composición promedio de una muestra que se seca durante la noche al vacío a temperatura de 70°C. sobre pentóxido de fósforo es de 55.95 por ciento de carbono y 7.89 por ciento de hidrógeno. El peso molecular de la sal de plata cristalina del Compuesto 38,295 que se determina de los datos de Rayos X es de 1060 ± 4 unidades de masa atómicas.



- REIVINDICACIONES -

1. Un procedimiento para producir el compuesto 38,295 antibiótico que tiene la fórmula



caracterizado por propagar el microorganismo Streptomyces hygroscopicus COAT 31050 a temperatura de 28° a 36°C. en un medio de cultivo acuoso que contiene una fuente asimilable de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas bajo condiciones aeróbicas sumergidas hasta que se obtenga un nivel de por lo menos 50 miligramos por litro del antibiótico.

6441076

- 31 -

5 2ª.- Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el compuesto 38,295 antibiótico se separa del caldo de fermentación extrayendo el caldo sin ajuste de pH, con un solvente orgánico inmiscible en agua, y aislando el antibiótico mediante cromatografía de columna de gel de sílice del extracto del solvente concentrado.

10 3ª.- Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el caldo de fermentación que contiene el antibiótico sin ajuste de pH se seca completamente.

4ª.- Un procedimiento para producir el compuesto 38295 antibiótico.

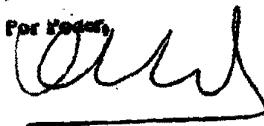
15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

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

Madrid, - 6 ABR. 1976

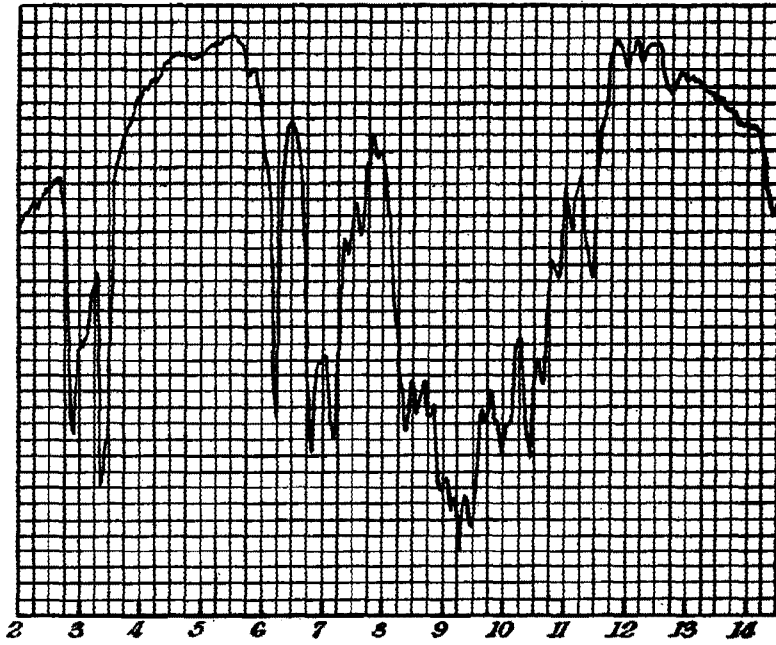
P.A.

Alberto de
For



P. 60968

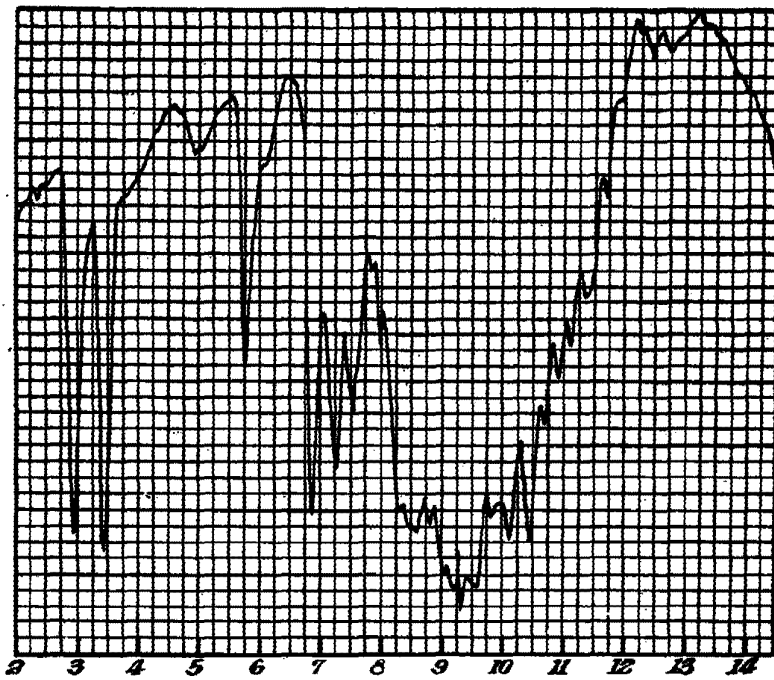
Fig. 1.



Alberto de ~~El-Arabi~~
Por Pfizer.

P.60965

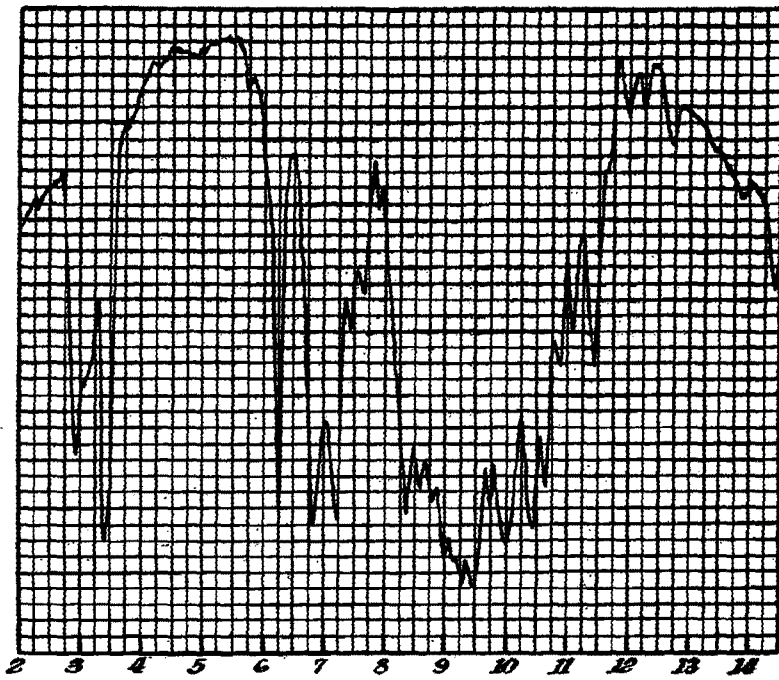
Fig. 2.



Alberto de Elia
Per Fides

P60965

Fig. 3.



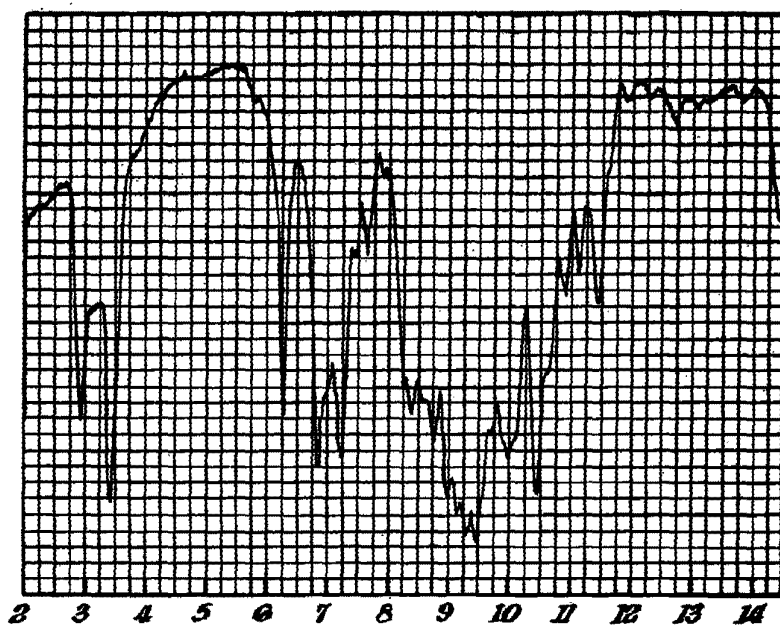
Alberto de Elizaguru
Por medio

6-60965

PFIZER INC.

IV/IV

Fig. A.



Alberto de Elzouru

Por favor