

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

⑩ ES	⑪ NUMERO	⑫ A 1
	⑬ FECHA DE PRESENTACION	

440.560

PATENTE DE INVENCION

⑤① PRIORIDADES: ⑤② NUMERO	⑤③ FECHA	⑤④ PAIS
37913/74	30 de agosto de 1.974	Inglaterra

⑤⑤ FECHA DE PUBLICIDAD	⑤⑥ CLASIFICACION INTERNACIONAL	⑤⑦ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D // A61K	

⑤⑧ TITULO DE LA INVENCION
Procedimiento de producción de nuevas rifamicinas.

⑦① SOLICITANTE (S)
GRUPPO LEPETIT S.p.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Via Durando 38, 20158 MILANO, ITALIA.

⑦② INVENTOR (ES)

⑦③ TITULAR (ES)

⑦④ REPRESENTANTE
GOMEZ-ACEBO.

Esta invención se relaciona con un procedimiento para preparar nuevos compuestos de rifamicina, mediante fermentación de cepas mutantes de Streptomyces mediterranei en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas. Estas nuevas rifamicinas son denominadas de aquí en adelante como rifamicina P, rifamicina Q, rifamicina R y rifamicina U.

Ya se ha sugerido que durante la fermentación en medios de crecimiento normales, Streptomyces mediterranei sintetiza una familia de antibióticos denominados colectivamente como complejo rifamicina (P. Sensi, et al., Antibiotics Annual 1959-1960, página 262). Ulteriores trabajos han revelado que la adición de dietilbarbiturato de sodio al medio de cultivo se traducía esencialmente en la formación de un solo producto de fermentación, rifamicina B (Margalith P. y Pagani H., Applied Microbiology, 9, 325, 1961). Según otro descubrimiento, se encontró una cepa mutante de Streptomyces mediterranei que produce esencialmente rifamicina B solo, independientemente de la presencia o ausencia de dietilbarbiturato de sodio en el medio de fermentación, de modo que se obtuvo un proceso mejorado para producir rifamicina B. La cepa productora de rifamicina B fue identificada como Streptomyces Mediterranei ATCC 21789. (Véase Patente USA No. 3.871.965).

Las nuevas sustancias antibióticas producidas por el procedimiento de esta invención, se obtienen mediante cepas mutantes derivadas de Streptomyces mediterranei ATCC 13685.

Las nuevas cepas se obtienen por tratamiento de la cepa ATCC 13685 con agentes mutagénicos químicos comunes tales como ácido nitroso o derivados de nitrosoguanidina o agentes mutagénicos físicos tales como rayos X y radiación U.V. Las nuevas cepas mutantes en lugar de pertenecer al género Streptomyces mediterranei son asignadas al género Nocardia de acuerdo con las

propuestas de J.E. Thiemann et al., Arch. Mikrobiol., 67,
147-155 (1969).

Aislamiento de las cepas mutadas productoras de las nuevas ri-
famincinas

5 Se trata una suspensión de esporas de Streptomyces
mediterranei ATCC 13685 con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
a 1 mg/ml, en un tampón de tris(hidroximetil)aminometano de pH 9,
durante 60 minutos, a 28°C. Las esporas tratadas con mutágeno
se lavan entonces y se colocan en discos Petri que contienen
10 agar de Bennett. Después de incubación durante 14 días a 28°C,
las colonias supervivientes son separadas y examinadas con res-
pecto a su capacidad para inhibir el crecimiento de Bacillus
Subtilis del siguiente modo: Se transfiere un disco de agar
(diámetro 4-8 mm) que lleva una sola colonia a un disco Petri
15 que contiene agar de Penassay a pH 7,2 previamente germinado a
2 % (v/v) con Bacillus Subtilis. Bajo estas condiciones, la ri-
famincina B es practicamente inactiva y una colonia normal pro-
ductora de rifamicina B no proporciona inhibición del crecimen-
to de Bacillus subtilis en el agar subyacente, mientras que
20 cualquier colonia productora de una nueva rifamicina con acti-
vidad antimicrobial causará una evidente zona de corte de inhi-
bición de crecimiento alrededor del disco de agar. De este modo
se aislaron tres cepas que fueron codificadas originalmente como
D-2, MM18-6 y M-36. Muestras de estos microorganismos fueron de-
25 positadas en ATCC en donde se identifican respectivamente como
Nocardia mediterranea ATCC 31064 Nocardia mediterranea ATCC 31065
y Nocardia mediterranea ATCC 31066.

Descripción de las nuevas cepas de Nocardia Mediterranea

30 La siguiente Tabla I resume los resultados del exa-
men macroscópico y microscópico de las cepas de Nocardia medite-
rranea identificadas respectivamente con el ATCC Nos. 31064,

31065 y 31066, y la Tabla 2 registra las características de cultivo de las mismas cepas de Nocardia mediterranea.

Igualmente, se registran las características de la cepa principal Streptomyces mediterranei ATCC 13685 (ME/83):

5

T A B L A 1

	Colonias	Micelio aéreo	Esporas
<u>N. mediterranea</u> ATCC 31064	Colonias cónicas-crate- rififormes y convolutivas, 2-3 mm de diámetro, marrón rojizas con pig- mento soluble amarillo ocre	Grisáceo o rosado, ramificado, 0,6 - 0,8 μ m de diámetro	Cilíndricas (0,8-1 μ m x 3,0 - 5,0 μ)
<u>N. mediterranea</u> ATCC 31065	Colonias cónicas-crate- rififormes y convoluti- vas, 2-3 mm de diáme- tro, naranja fuerte con pigmento soluble amarillo fuerte	Rosa o naranja claro, ramificado, 0,6-0,8 μ m de diámetro.	Cilíndricas (0,8-1 μ m x 3,0 - 5,0 μ)
<u>N. mediterranea</u> ATCC 31066	Colonias cónicas-crate- rififormes y convoluti- vas, 2-3 mm de diáme- tro, marrón naranja con pigmento soluble ámbar	Rosa o naranja cla- ro, ramificado, 0,6-0,8 μ m de diá- metro	Cilíndricas (0,8-1 μ m x 3,0- 5,0 μ)
<u>Streptomyces</u> <u>mediterranei</u> ATCC 13685 ME/83	Colonias cónicas-crate- rififormes y convultivas, 2-3 mm de diámetro, amarillo naranja con pigmento soluble ámbar claro	Rosáceo, ramifica- do, 0,6-0,8 μ m de diámetro	Cilíndricas (0,8-1 μ m x 3,0- 5,0 μ)

T A B L A 2

<u>Medios</u>	<u>N. mediterranea</u> ATCC 31064 (D-2)	<u>N. mediterranea</u> ATCC 31065 (MM 18-6)	<u>N. mediterranea</u> ATCC 31066 (M-36)	<u>Streptomyces mediterranei</u> ATCC 13685 (ME/83)
Agar de harina de avena	Crecimiento abundante con superficie ligeramente rugosa, marrón castaño con bordes naranja. Pigmento soluble beige rosado	Crecimiento abundante con superficie lisa, naranja. Trazas de micelio aéreo rosado. Algunas esporas. Pigmento soluble beige rosa	Crecimiento abundante con superficie lisa ámbar fuerte. Trazas de micelio aéreo rosa. Pigmento soluble ámbar quemado	Crecimiento claro con superficie lisa, amarillento con reverso rosado. Micelio aéreo blanco con matiz rosa. Trazas de pigmento soluble amarillento
Agar de glucosa de extracto de levadura (Medio No. 2 Shirling y Gottlieb)	Crecimiento abundante con superficie muy rugosa, ámbar. Micelio aéreo grisáceo, pigmento soluble de color herrumbre fuerte.	Crecimiento abundante con superficie muy rugosa, rojo ladrillo. Pigmento soluble de color herrumbre fuerte	Crecimiento abundante con superficie rugosa. Micelio vegetativo, ámbar quemado. Pigmento soluble ámbar quemado	Crecimiento abundante con superficie áspera amarillenta a rosa. Micelio aéreo escaso.
Agar de glucosa de Emerson	Crecimiento abundante con superficie muy rugosa y áspera, pigmento soluble ámbar rojo ladrillo	Crecimiento abundante con superficie muy rugosa y áspera, rojo ladrillo. Pigmento soluble ámbar.	Crecimiento abundante con superficie rugosa, ámbar quemado. Pigmento soluble ámbar quemado	Crecimiento abundante con superficie áspera, amarillento a naranja rosado. Micelio aéreo rosado. Pigmento soluble ámbar pálido
Agar de Bennett	crecimiento abundante, superficie muy rugosa, marrón rojizo. Trazas de micelio aéreo grisáceo. Pigmento soluble amarillo core	Crecimiento abundante con superficie muy rugosa, naranja fuerte. Pigmento soluble amarillo fuerte	Crecimiento abundante con superficie rugosa, marrón naranja. Pigmento soluble ámbar	Crecimiento bueno, amarillento tirando a amarillo naranja. Micelio aéreo rosado. Pigmento soluble ámbar claro.

T A B L A 2 (Continuación)

Medios	<u>N.mediterranea</u> ATCC 31064 (D-2)	<u>N.mediterranea</u> ATCC 31065 (MM 18-6)	<u>N.mediterranea</u> ATCC 31066 (M-36)	<u>Streptomyces</u> <u>mediterranei</u> ATCC 13685 (ME/83)
Agar de Penassay	Crecimiento moderado, superficie ligera <u>mente</u> rugosa, naranja claro. Sin pigmento soluble	Crecimiento abundante, ligeramente rugoso, naranja claro. Sin pigmento soluble	Crecimiento moderado con superficie lisa y fina, naranja claro. Sin pigmento soluble	Crecimiento pobre
Agar de molasa de extracto de levadura	Crecimiento abundante, muy rugoso, rojo ladrillo. Pigmento soluble de color herrumbre fuerte	Crecimiento abundante con superficie muy rugosa, rojo ladrillo. Pigmento soluble de color herrumbre fuerte	Crecimiento abundante con superficie áspera, ámbar quemado. Pigmento soluble ámbar quemado	Crecimiento abundante con superficie áspera incoloro a amarillento. Micelio aéreo blanco. Pigmento soluble ámbar fuerte
Agar de sacarosa de Czapek-Dox	Crecimiento moderado con superficie lisa y fina, naranja claro. Micelio aéreo rosa pálido. Algunas esporas. Pigmento soluble amarillo limón fuerte	Crecimiento bueno con superficie lisa, naranja. Micelio aéreo naranja claro	Crecimiento abundante con superficie lisa, salmón. Abundante micelio aéreo naranja rosado. Trazas de pigmento soluble amarillo claro	Crecimiento pobre con superficie fina, incoloro a melón claro. Trazas de micelio aéreo blanco rosado
Agar de patata	Crecimiento escaso, naranja claro. Pigmento soluble marrón castaño claro	Sin crecimiento	Crecimiento moderado con superficie lisa, naranja claro. Sin pigmento soluble	Crecimiento pobre con superficie fina, incoloro. Trazas de micelio aéreo blanco. Sin pigmento soluble.
Agar de asparagina de glucosa	Crecimiento abundante con superficie lisa, naranja. Pigmento soluble amarillo claro	Crecimiento escaso con superficie lisa, naranja claro. Sin pigmento soluble	Crecimiento claro, oro. Sin pigmento soluble	Crecimiento claro con superficie lisa y fina, rosa naranja claro. Algún pigmento soluble amarillo claro

T A B L A 2 (Continuación)

Medios	<u>N. mediterranea</u> ATCC 31064 (D-2)	<u>N. mediterranea</u> ATCC 31065 (MM 18-6)	<u>N. mediterranea</u> ATCC 31066 (M-36)	<u>Streptomyces</u> <u>mediterranei</u> ATCC 13685 (ME/83)
Agar de asparagina de glicerol (medio nº 5 Shirling y Gottlieb)	Crecimiento abundante con superficie lisa, naranja fuerte. Trazas de pigmento soluble amarillo	Crecimiento escaso, naranja fuerte. Sin pigmento soluble	Crecimiento moderado con superficie ligeramente rugosa, naranja fuerte. Trazas de pigmento soluble amarillo	Crecimiento claro con superficie lisa y fina, rosa naranja claro. Algún pigmento soluble amarillo claro
Agar nutriente	Crecimiento moderado con superficie lisa y fina, naranja pálido. Sin pigmento soluble	Crecimiento moderado con superficie rugosa y fina, naranja pálido. Sin pigmento soluble	Crecimiento claro con superficie fina y lisa, naranja. Sin pigmento soluble	Crecimiento moderado con superficie lisa, melón a naranja. Micelio aéreo blanco rosado
Agar de Fridham	Crecimiento moderado con superficie lisa y fina, ámbar. Micelio aéreo naranja rosado claro. Pigmento soluble rosado	Crecimiento abundante con superficie lisa, rojo ladrillo. Micelio aéreo rosa. Pigmento soluble amarillo	Crecimiento abundante, ligeramente áspero, marrón ámbar. Trazas de micelio aéreo rosado. Pigmento soluble marrón ámbar	Crecimiento moderado con superficie lisa, incoloro con manchas de color rojo langosta. Micelio aéreo rosa
Agar de almidón	Crecimiento moderado con superficie lisa, naranja. Abundante micelio aéreo rosa. Abundante producción de esporas. Pigmento soluble amarillo. Hidrolisis de almidón: negativa	Crecimiento moderado con superficie lisa, naranja fuerte. Trazas de pigmento soluble de color paja. Hidrolisis de almidón: negativa	Crecimiento abundante con superficie lisa, naranja. Trazas de micelio aéreo rosado. Pigmento soluble amarillo claro. Hidrolisis de almidón: negativa	Crecimiento pobre, incoloro a rosa naranja claro. Escaso micelio aéreo blanco. Hidrolisis de almidón: dudosa

T A B L A 2 (Continuación)

<u>Medios</u>	<u>N.mediterranea</u> ATCC 31064 (D-2)	<u>N.mediterranea</u> ATCC 31065 (MM 18-6)	<u>N.mediterranea</u> ATCC 31066 (M-36)	<u>Streptomyces</u> <u>mediterranei</u> ATCC 13685 (ME/83)
Agar de triptona de des-trosa	Crecimiento abundante con superficie rugosa, melón. Pigmento soluble melón naranja	Crecimiento moderado, rugoso, naranja. Pigmento soluble amarillo naranja	Crecimiento abundante con superficie rugosa, melón rosa. Pigmento soluble melón rosa	Crecimiento abundante, naranja rosa. Micelio aéreo rosado. Pigmento soluble amarillo oro claro
Agar de cobalto de Hickey y Tresner	Crecimiento moderado con superficie lisa y fina, incoloro, Micelio aéreo blancuzco. Pigmento soluble beige	Crecimiento abundante con superficie lisa, melón rosa. Pigmento soluble beige-rosa claro	Crecimiento moderado con superficie ligeramente rugosa, melón rosa. Pigmento soluble beige claro	Crecimiento moderado, naranja rosado claro. Algún micelio aéreo rosado. Pigmento soluble amarillento
Agar de tirosina (Medio nº 7 Shirling y Gottlieb)	Crecimiento abundante, con superficie muy rugosa y áspera, rojo ladrillo. Pigmento soluble amarillo fuerte. Reacción de tirosina: positiva (buena)	Crecimiento abundante, muy rugoso y áspero. Naranja fuerte. Pigmento soluble de color canela rosado. Reacción de tirosina: fuertemente positiva	Crecimiento abundante con superficie áspera, naranja quemado fuerte. Pigmento soluble ocre amarillo. Reacción de tirosina: fuertemente positiva	Crecimiento pobre
Agar de malato-Ca	Crecimiento escaso con superficie lisa y fina, amarillo naranja claro. Pigmento soluble limón cromo cerca del crecimiento y rosa coral en el medio. Hidrolisis: positiva	Crecimiento escaso, naranja claro. Hidrolisis de malato-Ca: negativa	Crecimiento pobre, naranja claro. Sin pigmento soluble. Digestión de malato-Ca: negativa	Crecimiento claro, incoloro. Micelio aéreo rosa blancuzco. Digestión parcial de malato-Ca

T A B L A 2 (Continuación)

Medios	<u>N. mediterranea</u> ATCC 31064 (D-2)	<u>N. mediterranea</u> ATCC 31065 (MM 18-6)	<u>N. mediterranea</u> ATCC 31066 (M-36)	<u>Streptomyces</u> <u>mediterranei</u> ATCC 13685 (ME/83)
Agar de albúmina de huevo	Crecimiento abundante con superficie lisa, naranja claro. Pigmento soluble amarillo claro	Crecimiento abundante con superficie lisa, naranja. Sin pigmento soluble	Crecimiento bueno con superficie lisa, amarillo naranja. Pigmento soluble amarillo claro	Crecimiento claro, rosa
Agar de glucosa de peptona	Crecimiento abundante, ligeramente rugoso, naranja fuerte. Micelio aéreo rosado. Pigmento soluble amarillo	Crecimiento abundante, rugoso, naranja fuerte. Pigmento soluble amarillo oro	Crecimiento abundante con superficie rugosa, ámbar quemado. Pigmento soluble ámbar quemado	
Gelatina	Hidrólisis: positiva	Hidrólisis: positiva	Hidrólisis: positiva	Hidrólisis: positiva
Caldo de nitrato	Reducción: negativa	Reducción: negativa	Reducción: negativa	Reducción: negativa
Leche tornasol	Sin coagulación Sin peptonización	Sin coagulación Sin peptonización	Sin coagulación Sin peptonización	Sin coagulación Sin peptonización
Agar de hierro de extracto de levadura de peptona (Medio nº 6 Shirling y Gottlieb)	Crecimiento moderado con superficie lisa, naranja pálido. Producción H ₂ S: negativa	Crecimiento moderado con superficie lisa, naranja pálido. Producción de H ₂ S: negativa	Crecimiento pobre con superficie lisa, incoloro. Sin pigmento soluble. Producción de H ₂ S: negativa	

T A B L A 2 (Continuación)

Medios	<u>N.mediterranea</u> ATCC 31064 (D-2)	<u>N.mediterranea</u> ATCC 31065 (MM 18-6)	<u>N.mediterranea</u> ATCC 31066 (M-36)	<u>Streptomyces</u> <u>mediterranei</u> ATCC 13685 (ME/83)
Agar de patata	Crecimiento escaso naranja	Crecimiento muy escaso, naranja	Crecimiento pobre, naranja claro	Crecimiento pobre, incoloro
Suero sanguíneo	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	
H ₂ O + agar Difco 2 %	Crecimiento escaso, incoloro. Trazas de micelio aéreo blanco. Abundante producción de esporas	Crecimiento escaso, incoloro. Trazas de micelio aéreo blanco. Abundante producción de esporas	Crecimiento escaso, incoloro. Trazas de micelio aéreo blanco. Abundante producción de esporas	
Agar de leche desnatada	Crecimiento abundante con superficie lisa naranja. Pigmento soluble amarillo cadmio. Hidrolisis de caseína: buena	Crecimiento bueno, ligeramente rugoso, naranja con sombreado marrón. Pigmento soluble marrón castaño. Hidrolisis de caseína: buena	Crecimiento abundante con superficie rugosa, naranja. Pigmento soluble marrón oro. Hidrolisis de caseína: fuertemente positiva	

Shirling y Gottlieb: Métodos para la caracterización de especies de *Streptomyces*, Intern. J. Syst. Bact., 16, 313-338 (1966).

La siguiente Tabla 3 registra las características fisiológicas de las nuevas cepas de Nocardia en comparación con aquellas de la cepa principal.

T A B L A 3

	N. mediterranea (D-2)	N. mediterranea (MM 18-6)	N. mediterranea (M-36)	Streptomyces mediterranei (ME/83)
Hidrólisis de almidón	-	-	-	+
Hidrólisis de tirosina	++	+++	+++	-
Hidrólisis de caseína	++	++	+++	
Hidrólisis de malato-Ca	+	-	-	+
Reducción de nitrato	-	-	-	-
Leche tor- nasol	Sin coagulación Sin peptonización	Sin coagulación Sin peptonización	Sin coagulación Sin peptonización	Sin coagulación Sin peptonización
Licuación de gelatina	++	++	++	+

La siguiente Tabla 4 registra la utilización de fuentes de carbono examinadas según el método de Pridham y Gottlieb (J. Bact. 56, 107, 1948).

T A B L A 4

	N.mediterranea (D-2)	N.mediterranea (MM 18-6)	N.mediterranea (M-36)	Streptomyces mediterranea (ME-83)
Arabinosa	+	+++	++	+++
Xilosa	+	+	++	++
Glucosa	++	+++	++	++
Mannosa	+	++	++	++
Fructosa	++	+++	++	++
Lactosa	+	+++	++	++
Sucrosa	+	+	++	++
Inositol	+	+	++	++
Ramnosa	+	+	++	++
Rafinosa	-	-	-	-
Salicina	+	+	+	+
Mannitol	++	+++	++	++
Glicina	+	+	+	-
Sorbitol	-	-	-	-
Ma-succinato	-	-	-	+
Na-citrato	-	-	-	-
Na-acetato	-	-	-	-
Inulina	+	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Celulosa	-	-	-	-
Maltosa	++	+++	++	+
Galactosa	+	++	++	+++
Glicerol	+	++	++	+++

FERMENTACION

El proceso de fermentación consiste esencialmente en cultivar uno de dichos mutantes de Streptomyces mediterranei en un medio nutriente que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno y sales minerales esenciales, hasta que se imparte a dicho medio una actividad antibiótica sustancial, y en extraer las rifamicinas a partir del medio. Más particularmente, estos mutantes se cultivan bajo condiciones sumergidas agitadas y aireadas a una temperatura que oscila entre 25 y 37°C, con preferencia a 28°C. Como fuentes de carbono, se pueden utilizar los siguientes carbohidratos y derivados carbonados: glucosa, galactosa, lactosa, sucrosa, maltosa, glicerol, manitol, etc. Fuentes de nitrógeno de utilidad son, por ejemplo, aminoácidos y sus mezclas, péptidos, proteínas y sus hidrolisatos, tal como peptona, extracto de levadura, harina de glicina, licor de maceración de maíz, solubles de pescado, extractos de carne, fracciones acuosas de semillas cereales. La fermentación se puede realizar durante 180-220 horas. El pH de partida, generalmente ajustado a 6,4-6,6 aproximadamente, aumenta al final de la fermentación a 7-8,5. Generalmente los mejores resultados se observan a las 200 horas de fermentación. Al término de la fermentación, las rifamicinas se pueden aislar por el siguiente procedimiento. El medio de fermentación se filtra al pH final de 7-8,5. El filtrado se acidifica rápidamente, preferiblemente a un pH menor de 5 aproximadamente, para asegurar la mejor estabilidad de la sustancia antibiótica. La actividad se extrae con disolventes inmiscibles en agua tales como cloroformo, butanol, acetato de etilo, de propilo, de butilo o de amilo. La proporción entre el volumen del medio y el del disolvente varía en función del disolvente elegido: generalmente se utiliza una proporción

del orden de 2:1 a 10:1.

El micelio retiene aún actividad microbiológica, la cual se extracta del micelio por medio de un disolvente inmiscible en agua, combinándose entonces con la fase orgánica, que contiene ya la mayor parte de las rifamicinas. Alternativamente, la extracción de la actividad del micelio se puede realizar por medio de un disolvente miscible con agua tal como acetona. En este caso, el líquido se filtra, se evapora la acetona in vacuo, se extractan las rifamicinas con un disolvente inmiscible en agua y se sigue el procedimiento como anteriormente se ha dicho.

Una vez que la mayoría de la actividad antibiótica ha sido transferida al disolvente, éste se destila in vacuo hasta sequedad, preferiblemente a una temperatura inferior a 30°C.

PURIFICACION

El extracto en bruto de rifamicina se puede purificar cromatográficamente en una columna de gel de sílice. Antes de la cromatografía, es conveniente disolver el extracto en bruto en un tampón fosfato de pH 7-8 y tratar a continuación con un agente oxidante suave. La solución tampón se extracta entonces con un disolvente inmiscible con agua. Este extracto orgánico contiene una nueva rifamicina denominada rifamicina R. La solución tampón extractada se acidifica a pH 2-4 y se extracta de nuevo con un disolvente inmiscible en agua. Este extracto orgánico contiene tres nuevos compuestos de la familia rifamicina, denominados rifamicinas P, Q y U respectivamente.

La purificación adicional de rifamicina R se efectúa por cromatografía en una columna de material adsorbente adecuado, tal como gel de sílice, y eluyendo con una mezcla adecuada de disolventes orgánicos.

El segundo extracto orgánico, que contiene rifamicinas P, Q y U, se purifica de forma similar a como se ha mencionado para la rifamicina R.

5 A continuación se ofrecen los siguientes ejemplos al objeto de ilustrar mejor el objeto de la invención.

EJEMPLO 1

La cepa mutante identificada como Nocardia mediterranea ATCC 31064 se propaga durante 6-8 días en agar de Bennett y se incuba a 28°C.

10 Con el cultivo obtenido del agar inclinado, se inoculan, bajo condiciones estériles, dos matraces Erlenmeyer de 500 ml. Los matraces contienen 100 ml del medio vegetativo de la siguiente composición:

15	Extracto de carne de vaca	5 g.
	Extracto de levadura	5 g.
	Peptona	5 g.
	Hidrolisato de caseína	3 g.
	Glucosa	20 g.
	NaCl	1,5 g.
20	H ₂ O hasta	1 litro.

El pH se ajusta a 7,3 con hidróxido sódico.

Los matraces así inoculados se colocan en un vibrador alternativo a 28°C durante 72 horas. El contenido de los dos matraces Erlenmeyer se utiliza como inóculo vertiéndolo en un prefermentador de 10 litros que contiene 4 litros del citado medio vegetativo. La incubación se efectúa a 28°C con una agitación de 300 rpm y una aireación de 1 v/v/m. Después de 48 horas de crecimiento, se obtiene un volumen de 7-10 % de células empa-
25 cadas. En la siguiente etapa, se utiliza un fermentador de vidrio de 10 litros que contiene 4 litros del medio de fermenta-
30

ción a continuación indicado:

	Harina de cacahuete	25 g.
	Harina de glicina	5 g.
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9,5 g.
5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,85 g.
	Glucosa	95 g.
	Glicerol	40 g.
	KH_2PO_4	1 g.
	Propilenglicol	5 g.
10	CaCO_3	8,5 g.
	dietilbarbitúrico Na	1,7 g.
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,8 mg.
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,5 mg.
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,5 mg.
15	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3,4 mg.
	$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,7 mg.
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,85 mg.
	H_2O hasta	1 litro.

20 El pH se ajusta a 7,8 con hidróxido sódico. Se esteriliza durante 60 minutos a 120°C. Después de esterilizar, el pH es de 6,4. Como inóculo se utiliza una cantidad del contenido del prefermentador igual al 5 % del contenido del fermentador.

25 La fermentación se realiza a 28°C con una agitación a 750 rpm y una aireación a una velocidad de 1 v/v/m. Como anti-espuma se utiliza silicona A. El caldo de cultivo vira a un color marrón rojizo característico durante la fermentación. Después de 200 horas de crecimiento, se obtiene un volumen de células empacadas. El pH del caldo es de 7,5 y en este momento se recoge dicho caldo.

EJEMPLO 2

Un cultivo de Nocardia mediterranea ATCC 31064, obtenido como se describe en el ejemplo 1, se prepara un matr az, bajo agitación, en la forma descrita en el ejemplo 1. Para el precultivo, se vierte en un fermentador de cristal de 10 litros que contiene 4 litros del siguiente medio:

	Glucosa	5 g.
	Harina de cacahuete	7,5 g.
	CaCO ₃	1,65 g.
10	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,33 g.
	KH ₂ PO ₄	0,33 g.
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	3,3 mg.
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	16,5 mg.
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	1,3 mg.
15	H ₂ O hasta	1 litro.

El pH se ajusta a 7,5. Se esteriliza durante 50 minutos a 120 C. Después de la esterilización, el pH es de 6,4. Después de 48 horas de crecimiento, el v lumen de células empa-cadas es de 6-8 % del v lumen total. Se utiliza un inóculo igual al 10 % para un fermentador de cristal de 20 litros que contiene 10 litros del siguiente medio de fermentación:

	Licor de maceración de maíz	20 g.
	Harina de glicina	15 g.
	(NH ₄) ₂ SO ₄	6 g.
25	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,85 g.
	Glucosa	100 g.
	KH ₂ PO ₄	1 g.
	CaCO ₃	6 g.
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	8,5 mg.
30	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	42,5 mg.

MnSO ₄ ·4H ₂ O	3,4	mg.
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,8	mg.
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,7	mg.
H ₂ O hasta	1	litro.

5 El pH se ajusta a 7,8 con hidróxido sódico. Se esteriliza durante 50 minutos a 120°C. Después de esterilizar, el pH es de 6,4. La fermentación se realiza a 28°C durante 200 horas. El pH del caldo de fermentación, en el momento de la cosecha, es de 7,5.

10 Los caldos de fermentación obtenidos en los ejemplos 1 y 2 se purifican del siguiente modo. El micelio se separa por filtración y se desecha, se ajusta el filtrado a pH 2 con ácido clorhídrico al 10 % v/v y se extrae tres veces con un volumen igual de acetato de etilo. Este extracto orgánico se concentra hasta sequedad bajo vacío a 35°C y el residuo (4 g del ejemplo 1
15 y 11 g del ejemplo 2) se disuelve en tampón fosfato sódico 0,05M pH 7,5 y se añade nitrito sódico para dar una concentración final de 0,2 % p/v. Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, la solución tampón se extrae tres veces
20 con un volumen igual de acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se concentran hasta sequedad bajo vacío a 35°C (primer extracto de acetato de etilo). La solución tampón agotada se ajusta a pH 2 con ácido clorhídrico al 10 % y se extrae
25 con un volumen igual de acetato de etilo tres veces. Los extractos orgánicos combinados se concentran hasta sequedad bajo vacío a 35°C (segundo extracto de acetato de etilo).

El polvo seco del primer extracto de acetato de etilo (1,4 g del ejemplo 1 y 4,2 g del ejemplo 2) se disuelve en cloroformo y se cromatografía en una columna de gel de sílice
30 (malla 70-230 ASTM) utilizando cloroformo que contiene 2 % v/v

de alcohol metílico como eluente. La rifamicina R es el primer producto principal eluido de la columna, reconocible por su color marrón anaranjado.

5 En la cromatografía de capa fina utilizando
placas de gel de sílice (Merck 60 F₂₅₄) con cloroformo:alcohol
metílico como sistema disolvente (95:5), la rifamicina R tiene
un valor R_f de 0,59. Las fracciones que contienen rifamicina R
se combinan, se evaporan hasta sequedad bajo vacío a 35°C, se
10 redissuelve en acetato de etilo, el cual se lava entonces con
ácido clorhídrico 0,01 N y por último con agua. El extracto orgá-
nico se concentra en pequeño volumen y la rifamicina R cristali-
za en solución a 4°C (obteniéndose 600 mg del ejemplo 1 y
1,6 g del ejemplo 2). El segundo extracto de acetato de etilo
se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice
15 de modo similar a la rifamicina R. El residuo seco (2,4 g del
ejemplo 1 y 4,2 g del ejemplo 2) se disuelve en cloroformo y se
aplica a gel de sílice.

La columna se eluye con una mezcla de cloro-
formo y alcohol metílico (98:2). El primer compuesto que sale
20 es rifamicina U, a continuación rifamicina P y por último ri-
famicina Q. Estos tres compuestos tienen un color naranja ama-
rillento en la solución eluente y se pueden identificar sobre
la base de su movilidad en la cromatografía de capa fina. Sobre
placas de gel de sílice (Merck 60 F₂₅₄) utilizando cloroformo/me-
25 tanol (95:5) como sistema disolvente, los valores R_f son los
siguientes:

rifamicina U	R _f = 0,63
rifamicina P	R _f = 0,57
rifamicina Q	R _f = 0,32

30 Las fracciones adecuadas que contienen rifami-

5 cinas U, P y Q se combinan, se evaporan hasta sequedad bajo vacío y se cristalizan en acetato de etilo. A partir del primer ejemplo se obtienen 80 mg de rifamicina U, 400 mg de rifamicina P y 280 mg de rifamicina Q; a partir del segundo ejemplo se obtienen 190 mg de rifamicina U, 900 mg de rifamicina P y 750 mg de rifamicina Q.

10 Siguiendo esencialmente el mismo procedimiento de los ejemplos anteriores, pero utilizando respectivamente Nocardia mediterranea ATCC 31065 ó Nocardia mediterranea ATCC 31066 como cepas productoras, se obtienen rendimientos del mismo orden que los anteriormente indicados:

Características físico-químicas de las nuevas rifamicinas

Rifamicina P

1) Análisis elemental (%):

15 Encontrado C=60,6; H=6,2; N=3,8; O=25,2; S=4,1

2) Bandas de absorción U.V. y visibles:

El compuesto muestra los siguientes valores:

	metanol		0,1 N HCl	
	λ_{max} (m μ)	$E_{1\%}^{1cm}$	λ_{max} (m μ)	$E_{1\%}^{1cm}$
20	406	197	416	183
	350	(hombro)	300	319
	297	344	225	521
	257	423		
	224	550		

25 El gráfico completo del espectro se ofrece en la figura 1. El espectro fue registrado con el instrumento Perkin Elmer Spectracord 4000 A.

3) Espectro infrarrojo:

Las crestas de absorción más significativas en Nujol se presentan en las siguientes frecuencias (cm^{-1}):
3700-3150 (m,br); 3100 (w); 3060-2800 (vs); 1465 (s); 1380 (s);

Nujol; 1722 (m); 1645 (m,br); 1580 (m); 1510 (m); 1325 (m);
1250 (s br); 1160 (m); 1130 (w); 1070 (m, br) 1030 (w); 982 (m)
5 960 (m); 925 (w); 890 (m); 818 (w); 770 (w); 735 (w).

Un gráfico completo del espectro I.R. se ofrece en la figura 2. El espectro fue registrado con un instrumento Perkin Elmer Mod. 421.

4) Espectro de masa:

10 El espectro de masa obtenido a 70 e V muestra la cresta de ion molecular M^+ en el siguiente valor m/e : 738.

El espectro fue registrado con un instrumento Hitachi Perkin Elmer RMU-6L.

5) Espectro de resonancia magnética nuclear:

15 El gráfico completo del espectro RMN a 100 MHz en CDCl_3 se ofrece en la figura 3.

Este compuesto no muestra el comportamiento polarográfico característico de las rifamicinas que poseen una mitad cromófora con estructura quinónica.

20

Rifamicina Q

1) Análisis elemental:

Encontrado C=60,7; H=6,3; N=3,60; O=25,3; S=4,2

2) Bandas de absorción U.V. y visibles:

El compuesto muestra los siguientes valores en metanol:

λ_{max} (m μ)	E ₁ % 1 cm
406	178
350	(hombro)
297	305
257	405
224	518

5

3) Espectro infrarrojo:

Las crestas de absorción más significativas en Nujol se presentan en las siguientes frecuencias (cm⁻¹):

10

3700-3300 (s, br); 3300-3080 (m br); 3040-2780 (vs); 1460 (s); 1378 (s); Nujol; 1740 (m); 1700 (m); 1650 (s, br); 1605 (s, br); 1555 (s); 1510 (m, br); 1315 (w); 1275 (m); 1240 (m); 1220 (m); 1160 (m); 1090 (m); 1050 (m, br); 1020 (w); 970 (m); 945 (w); 910 (m); 808 (m); 765 (w); 720 (w).

15

Un gráfico completo del espectro I.R. se ofrece en la figura 4.

4) Espectro de resonancia magnética nuclear:

El gráfico completo del espectro RMN a 60 MHz_z en CDCl₃ se ofrece en la figura 7.

20

Rifamicina R

1) Análisis elemental:

Encontrado: C=62,0; H=6,4; N=2,2; O=29,6

2) Bandas de absorción U.V. y visibles:

25

El compuesto muestra los siguientes valores en ácido clorhídrico 0,1 N en metanol:

λ_{\max} (m μ)	E ₁ % 1 cm
219	444
281	415
340	114
410	72

5

3) Espectro infrarrojo:

Las crestas de absorción más significativas en Nujol se presentan en las siguientes frecuencias (cm⁻¹):

10

3700-3100 (s br); 3040-2780 (vs); 1465 (s); 1380 (s); Nujol;
1745 (s); 1710 (m); 1640 (s); 1600 (s); 1505 (s); 1415 (m);
1325 (s); 1260 (s, br); 1220-1130 (s, br); 1120 (w); 1075 (s);
1020 (w); 975 (s); 950 (w); 920 (w); 888 (m); 823 (m); 785
(w, br); 735 (w, br); 650 (w, br).

15

Un gráfico completo del espectro I.R. se ofrece en la figura 5.

4) Espectro de masa:

El espectro de masa obtenido a 70 e V muestra la cresta de ion molecular M⁺ en el siguiente valor m/e: 711.

20

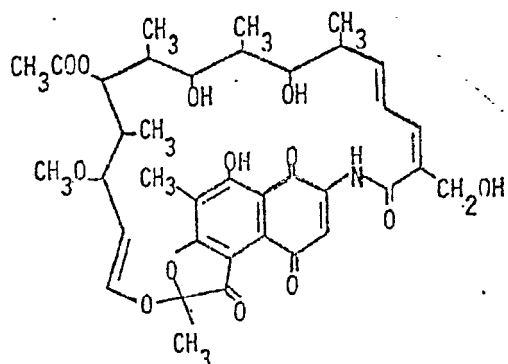
5) Espectro de resonancia magnética nuclear:

El gráfico completo del espectro RMN a 60 MHz en CDCl₃ se ofrece en la figura 6.

25

El compuesto muestra el comportamiento polarográfico característico de las rifamicinas que poseen una mitad cromófora con estructura quinónica.

Los anteriores datos soportan la siguiente estructura para la rifamicina R.



Rifamicina U

1) Bandas de absorción U.V. y visibles:

El compuesto muestra los siguientes valores

en metanol:

5

λ_{max} (m μ)	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$
412	163
353	(hombro)
299	265
258	389
220	451

10

2) Espectro infrarrojo:

Las crestas de absorción más significativas en Nujol se presentan en las siguientes frecuencias (cm⁻¹):

15

3700-3100 (m,br); 3060 (vw); 3040-2740 (vs), 2720 (vw), 1460 (s);
 1378 (m); Nujol; 1750-1705 (m,br); 1680-1620 (m,br); 1600 (s);
 1558 (s); 1490 (w, hombro); 1308 (w); 1270 (w, hombro);
 1245 (m, hombro); 1225 (m); 1160 (m); 1120 (w); 1090 (vw);
 1070 (w); 1030 (vw); 1020 (vw); 1000 (vw); 975 (w); 960 (w,
 hombro); 905 (m); 850 (m); 802 (w); 800 (vw, hombro); 777 (vw)
 760 (vw); 720 (vw); 685 (vw); 670 (vw).

20

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS

El espectro de actividad in vitro de las rifamicinas P, Q y R se ofrece en la siguiente Tabla:

Cepas	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)			
	Rifamicina P	Rifamicina Q	Rifamicina R	Rifamicina U
Staphylococcus aureus ATCC 6538	0,00235	0,039	0,019	0,05-0,1
Staphylococcus aureus ATCC 6538 (20 % de suero bovino)	0,00235	0,078	0,0047	-
Staphylococcus aureus Tour	0,0035	0,06	0,00235	-
Staphylococcus aureus Tour rifampicina-resistente	25-50	>100	100	-
Streptococcus hemolyticus C 203	0,0047	0,019	0,00312	-
Streptococcus faecalis ATCC	0,0035	0,312	0,19	-
Diplococcus pneumoniae UC 41	0,0047	0,039	0,00625	-
Proteus vulgaris X 19 H ATCC 881	0,78	12,5	12,5	-
Escherichia coli ATCC 10536	3,12	12,5	50	>50
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	12,5	50	-	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145	12,5	50	100	-
Mycobacterium tub. H37RV ATCC 9360	1	2,5	0,1	2,5
-: Actividad no determinada				

Los nuevos compuestos son activos también en animales de laboratorio inyectados con Staphylococcus aureus, Escherichia coli.

5 La siguiente Tabla registra los resultados de los experimentos representativos efectuados en ratones en comparación con una rifamicina natural conocida, es decir rifamicina SV:

Compuesto	Cepa de infección	ED ₅₀ mg/kg	
		s.c.	o.s
10 rifamicina P	<u>Staphylococcus aureus</u>	0,3	0,8
rifamicina P	<u>Escherichia coli</u>	40	-
rifamicina Q	<u>Staphylococcus aureus</u>	8	-
rifamicina SV	<u>Staphylococcus aureus</u>	17	74

15 La rifamicina P, que resulta ser la rifamicina natural más activa hasta ahora aislada, tiene también una baja toxicidad puesto que su valor LD₅₀ en ratones es superior a 500 mg/kg. i.p.

20 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento de producción de nuevas rifamicinas, identificadas como rifamicina P, rifamicina Q, rifamicina R y rifamicina U, caracterizado porque comprende las etapas de fermentar, bajo condiciones aeróbicas, en presencia de una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable y sales minerales esenciales, una cepa mutante de Nocardia mediterranea seleccionada entre Nocardia mediterranea ATCC 31064 (D-2), Nocardia mediterranea ATCC 31065 (MM18-6) y Nocardia mediterranea ATCC 31066 (M-36) y sus equivalentes, hasta que el medio de fermentación muestra una actividad anti-
10 tibiótica sustancial; recuperar las nuevas rifamicinas del medio de fermentación; y finalmente separar cada una de las rifamicinas obtenidas como único producto residual.

15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fermentación se efectúa a una temperatura entre 25 y 37°C durante 180-200 horas, a un pH comprendido entre 6,4 y 8,5 aproximadamente.

20 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la recuperación de las nuevas rifamicinas se efectúa extractando el caldo de fermentación con un disolvente no miscible con agua a un pH inferior a 5.

25 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las nuevas rifamicinas se separan en componentes individuales por cromatografía en columna.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las citadas cepas mutantes de Nocardia mediterranea y sus equivalentes, se preparan por tratamiento de esporas de Streptomyces mediterranei ATCC 13685 con un

agente mutagénico; incubación de las esporas tratadas con mutágeno durante 14 días a 28°C sobre agar Benett; y aislamiento de las colonias supervivientes que son capaces de inhibir el crecimiento de Bacillus subtilis.

5

6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el agente mutagénico es N-metil-N¹-nitro-N-nitrosoguanidina y el tratamiento con dicho agente mutagénico se efectúa a un pH de 9,0 y a 28°C.

10

7.- Procedimiento de producción de nuevas rifamicinas, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria, e ilustrado en los dibujos adjuntos.

Esta Memoria consta de 27 hojas escritas a máquina por una sola cara.

FEB. 1977

Madrid,

15

GRUPPO LEPETIT S.p.A.

GOMEZ ACEBO Y MUDER
p. p. Firmado: L. Goeta Fernández

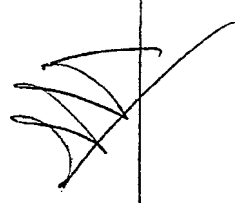
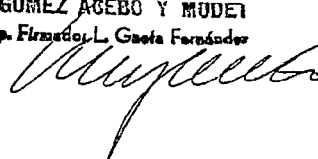
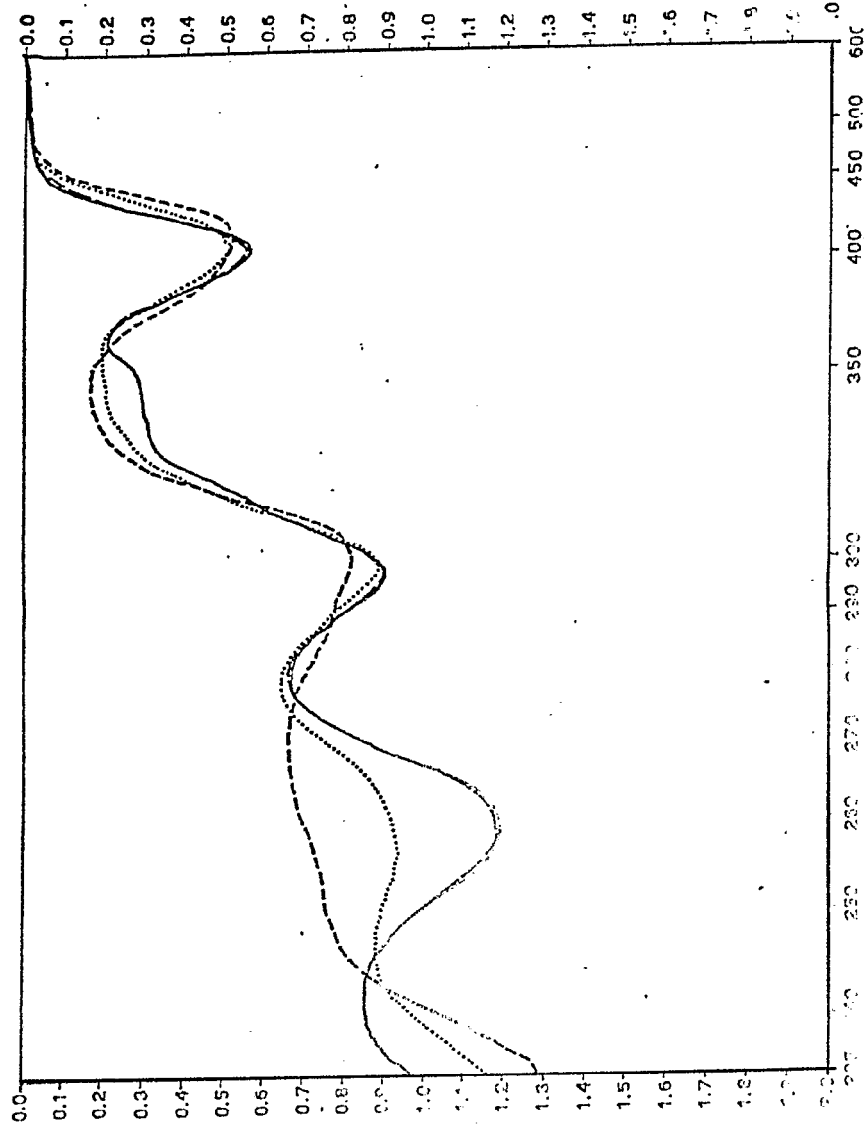


FIG.1



ESCALA
VARIABLE

Madrid

GONZALEZ ACEBO Y MC
DE SA. FERNANDEZ L. GARCIA PARRA

FIG.1

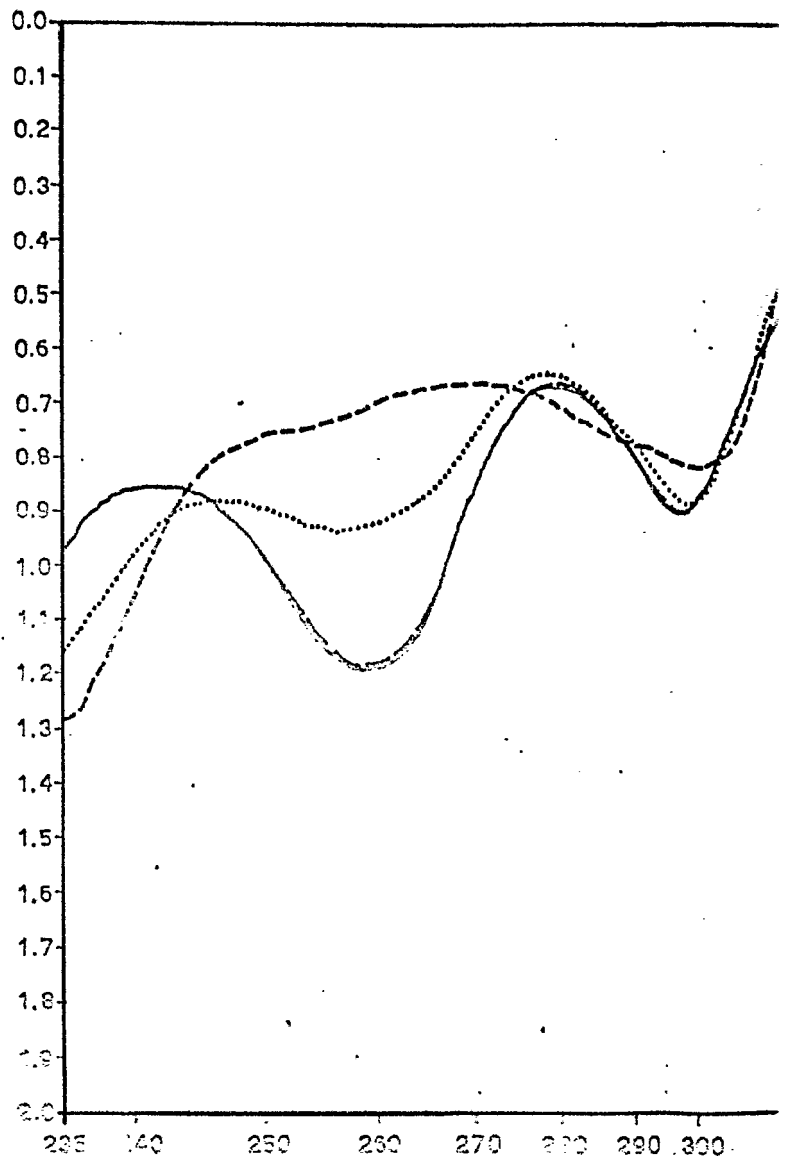
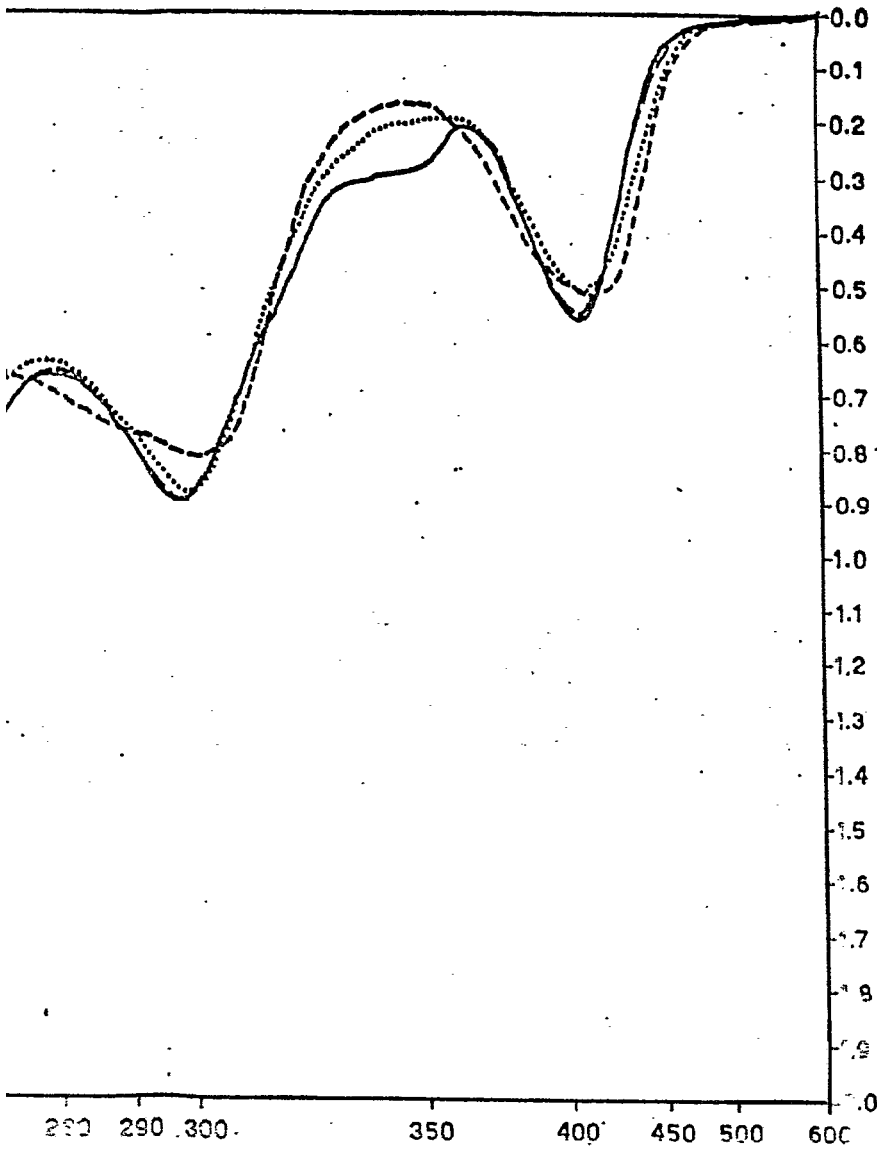


FIG.1



ESCALA
VARIABLE

1 FEB. 1977

Madrid

GOMEZ ACEBO Y MU

D. Firmador: L. Gaeta Ferná

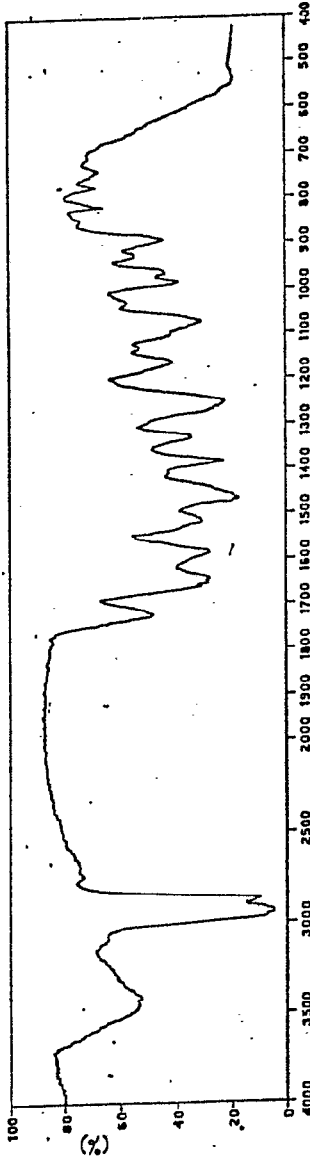


FIG. 2

ES CALA
VARIABLE

Madrid 1 de Mayo de 1977

RODRIGUEZ ADESA 177
Sr. Dr. Filmedo L. Concha E.

FIG. 2

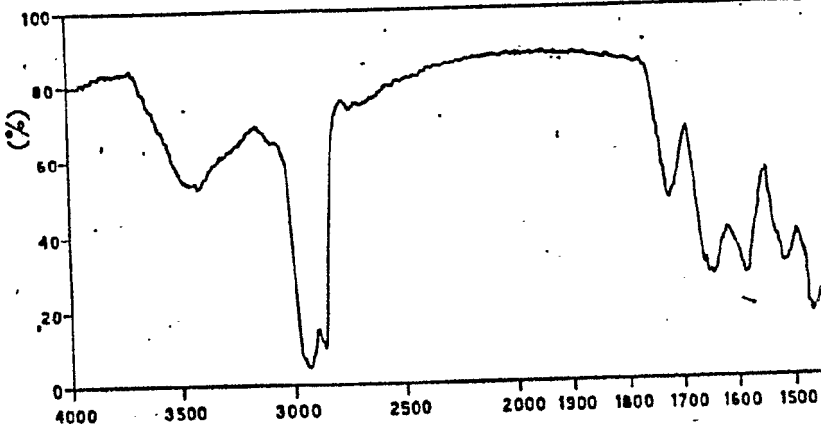
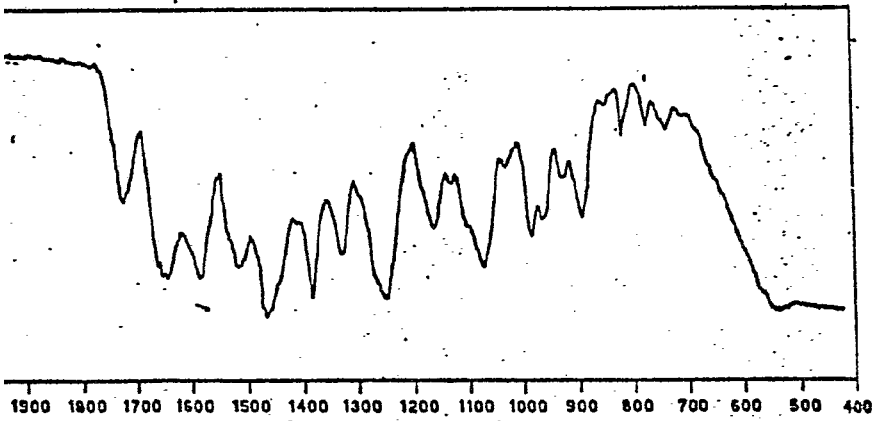


FIG. 2

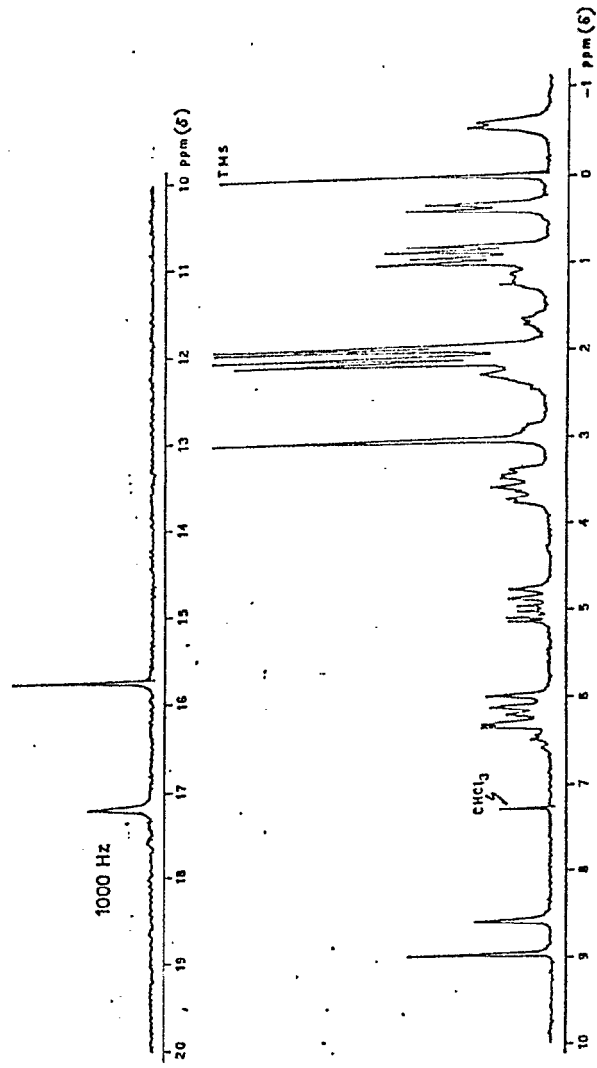


ESCALA
VARIABLE

Madrid 1 FEB. 1977

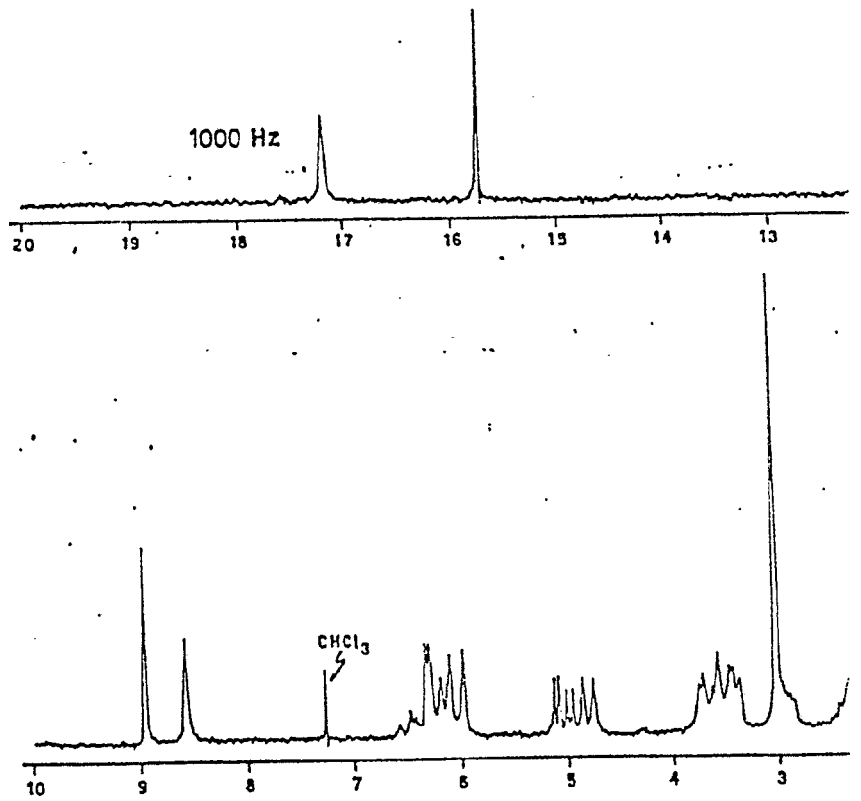
GOMEZ ACEBO Y P
D. Firmador: L. Goñiz Fe

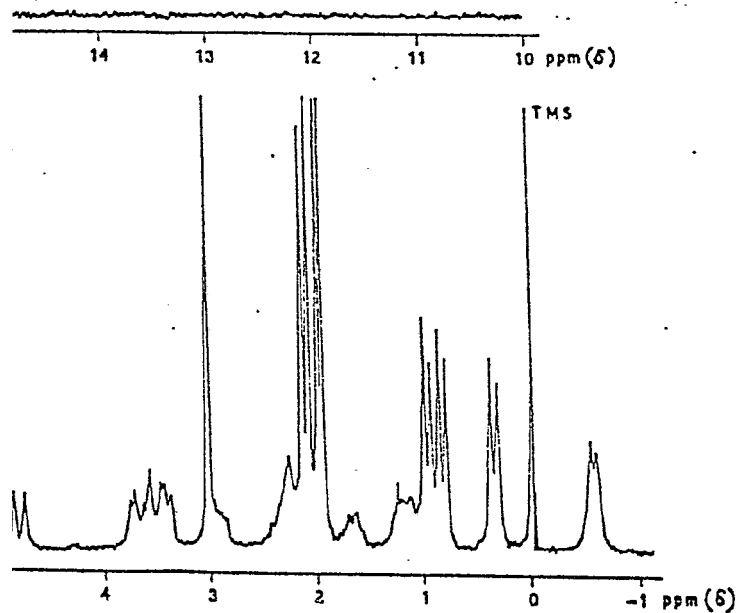
FIG.3



Madrid 1 Feb. 877
SERRAZ ADEBIO Y M...
D. Firmado: L... E...

FIG.3





5000
V. 10/10/3

Madrid 1 Feb. 1977

GOMEZ ACERO Y M...
D. Firmador: L. Costa E...

FIG. 4

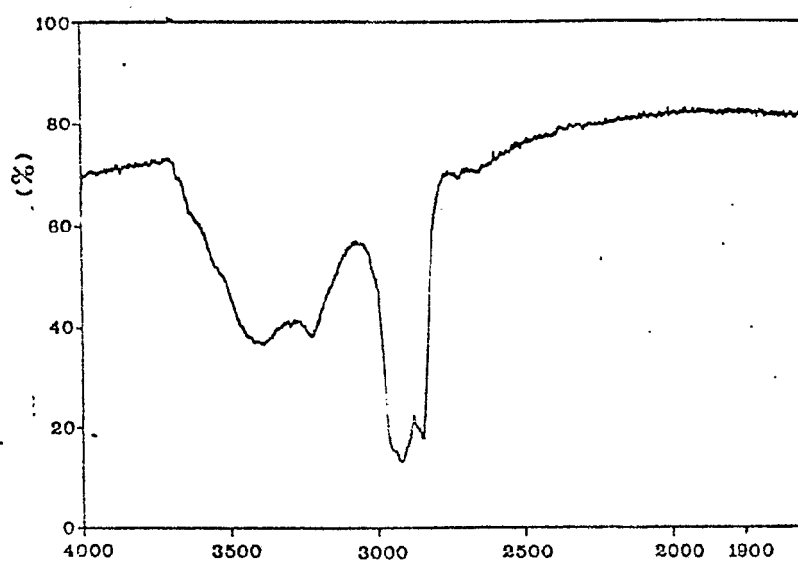
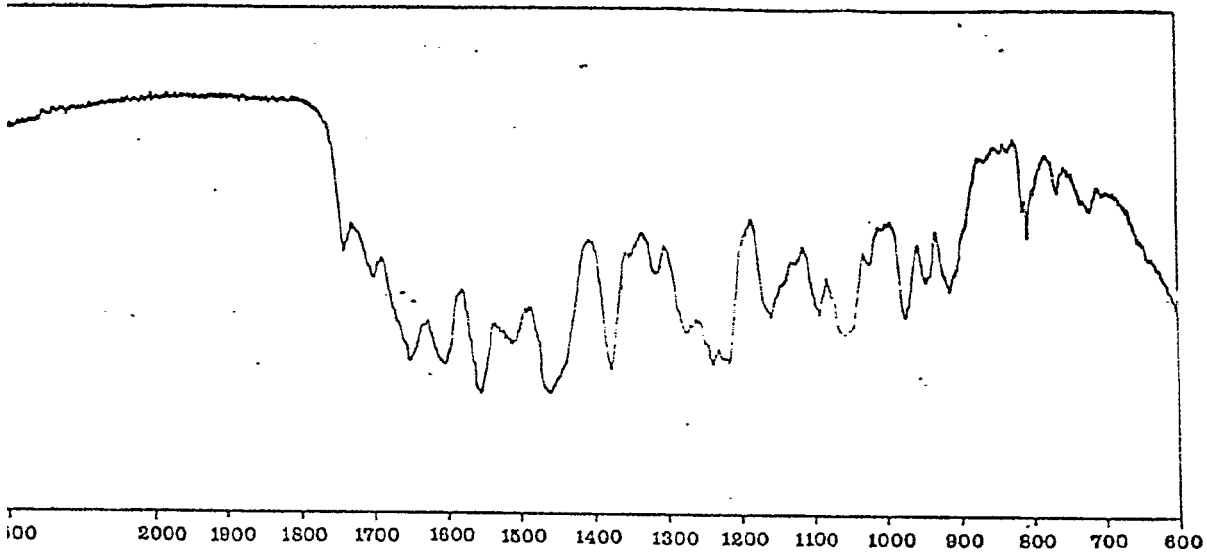
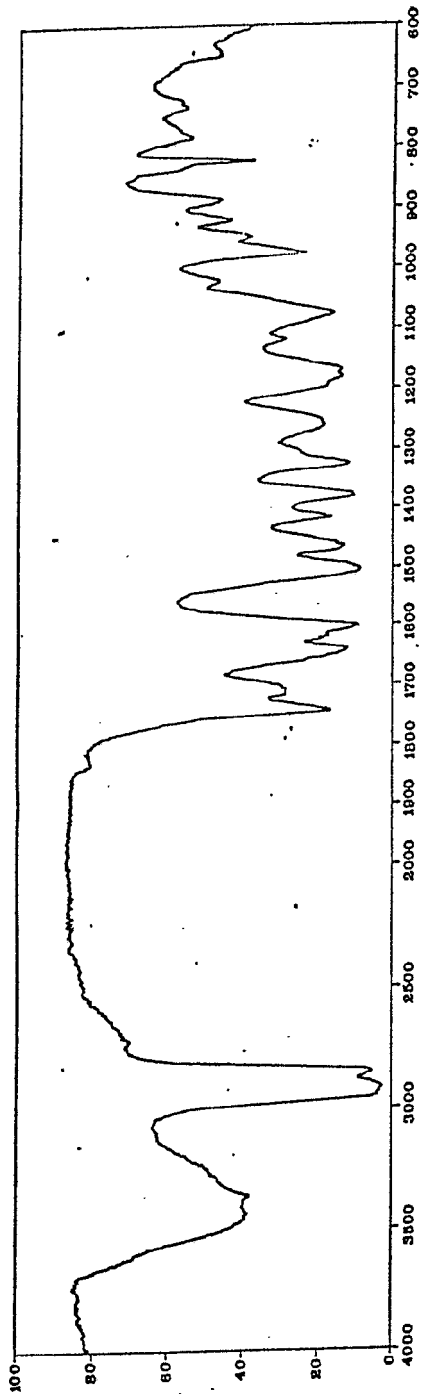


FIG. 4



MAGMA 7 57 1977
GONZALEZ SPP
Dr. Flaminio L.
[Handwritten signature]

FIG. 5



Madrid 1 Feb 1977

SOMEZ AJCERRA
P. Filmedo, L.

FIG. 5

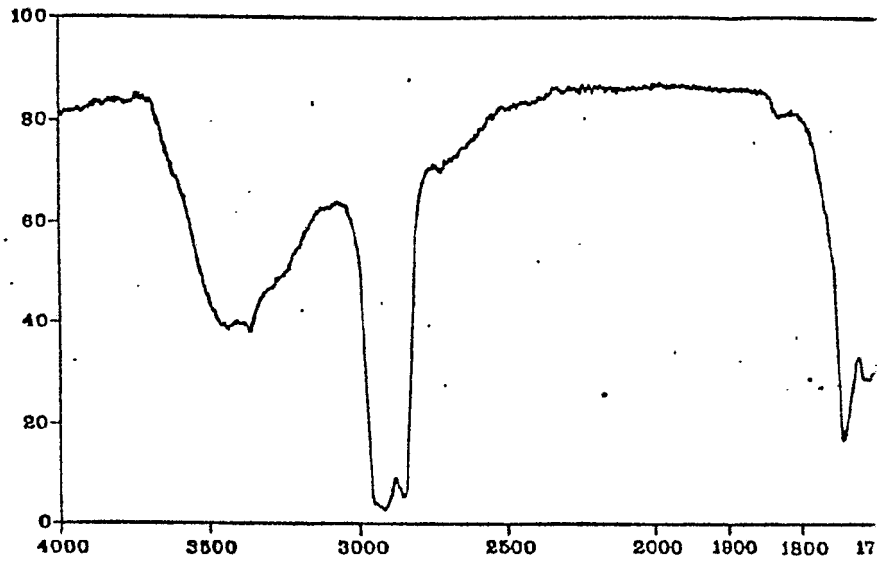
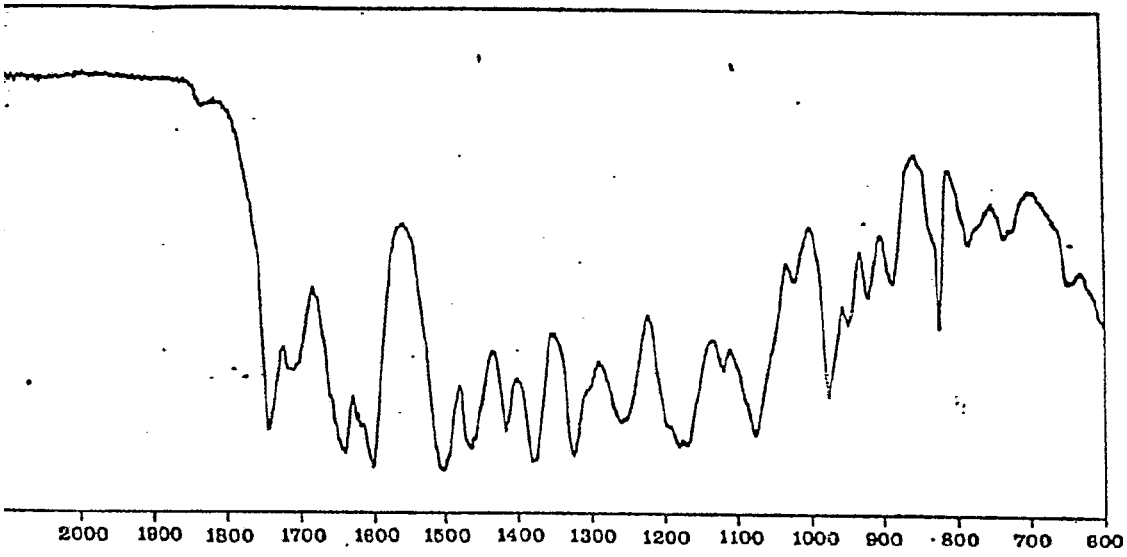


FIG. 5

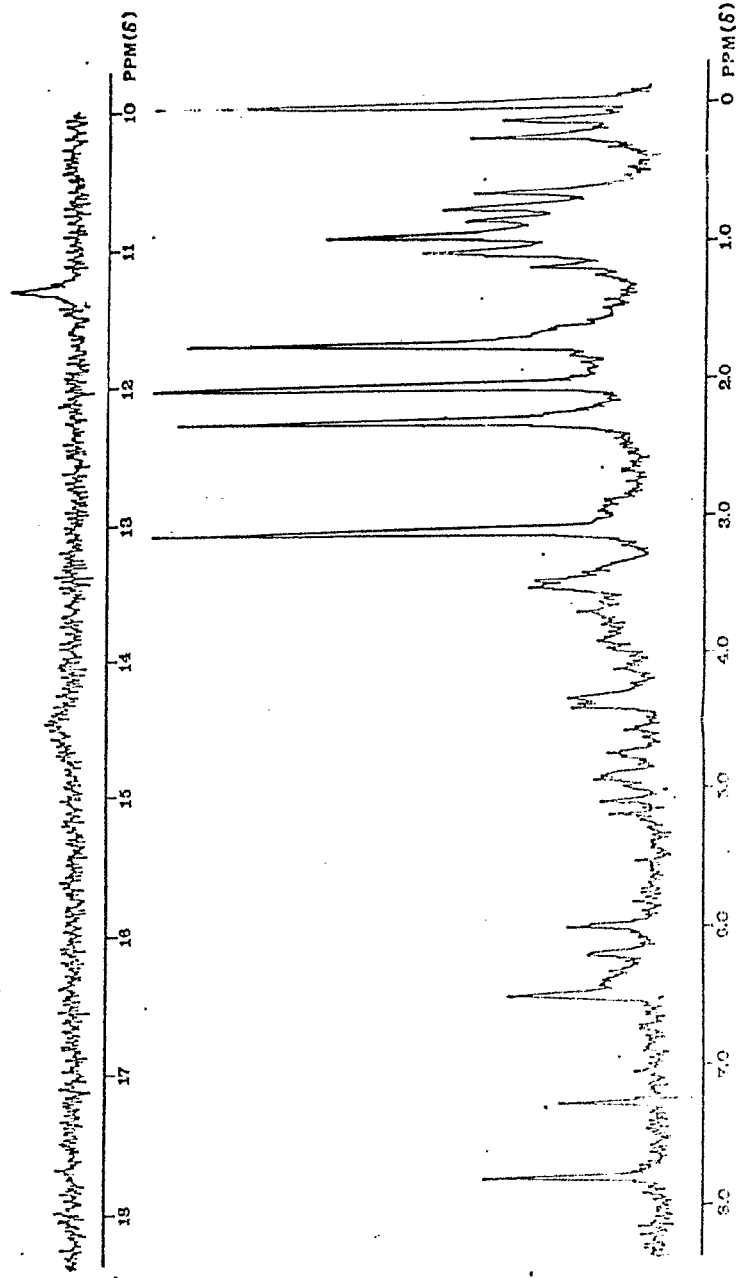


Madrid 1 FEB 1977

GOMEZ ACERO Y

Firmado: L. G. G.

FIG. 6



ESCALA
VARIABLE

Madrid

GOMEZ PARRA

Pr. F. Martínez

FIG. 6

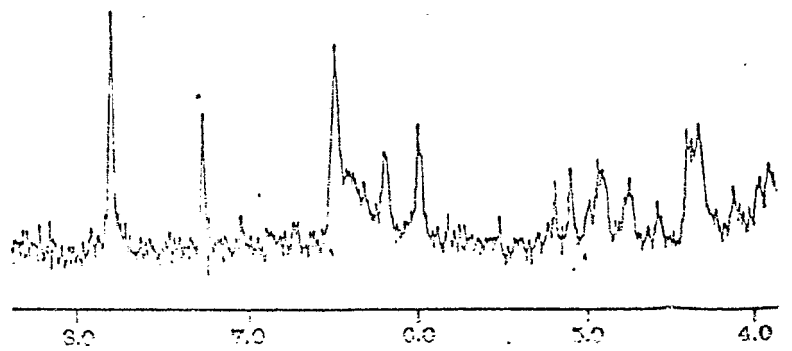
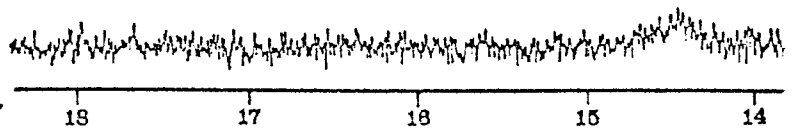
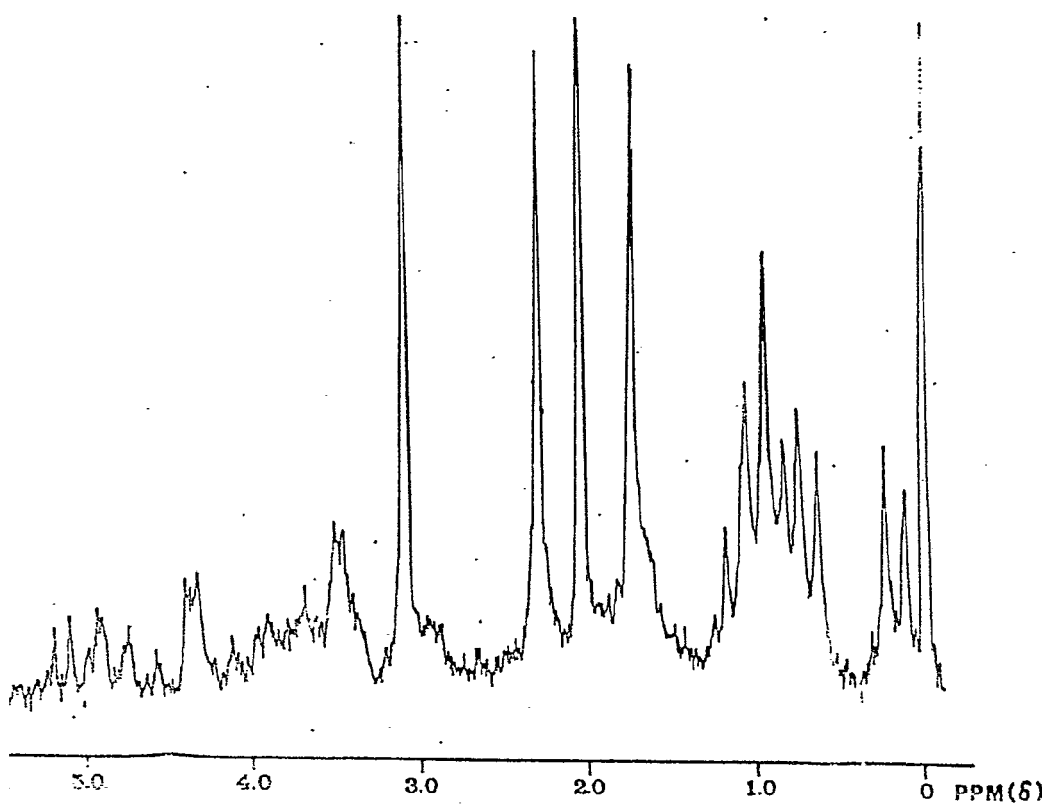


FIG. 6

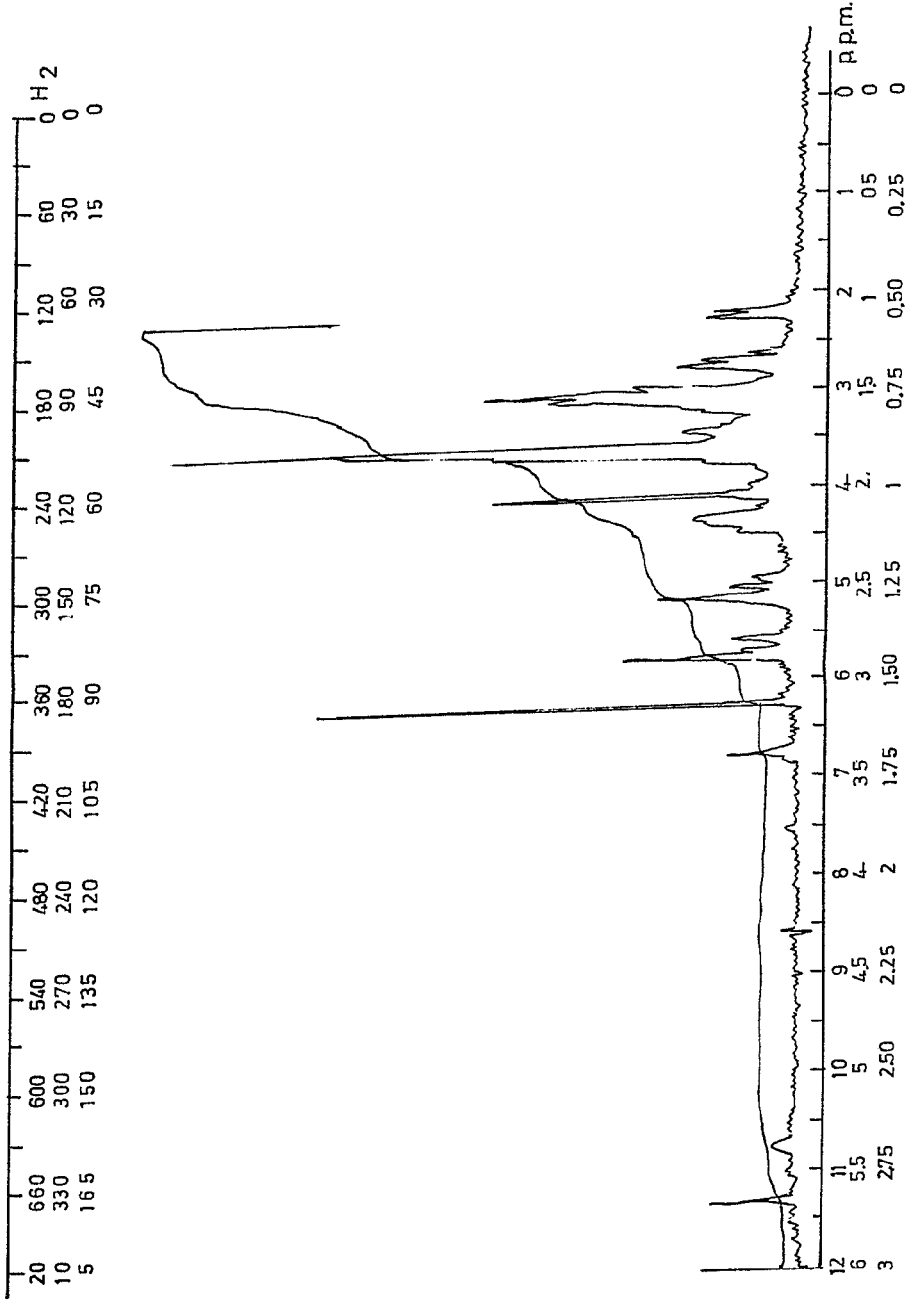


ESCALA
VARIABLE

Madrid 1 FEB 1977

GOMEZ ACER...
D. Firmador: L. ...

FIG. 7

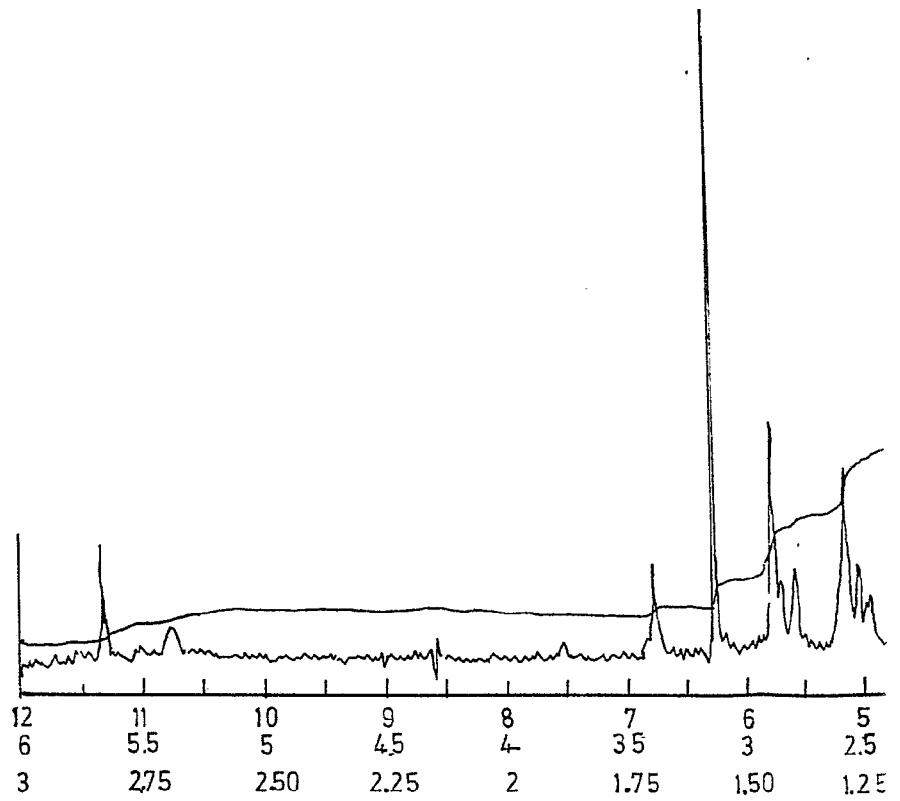


SCALA
VARIABLE

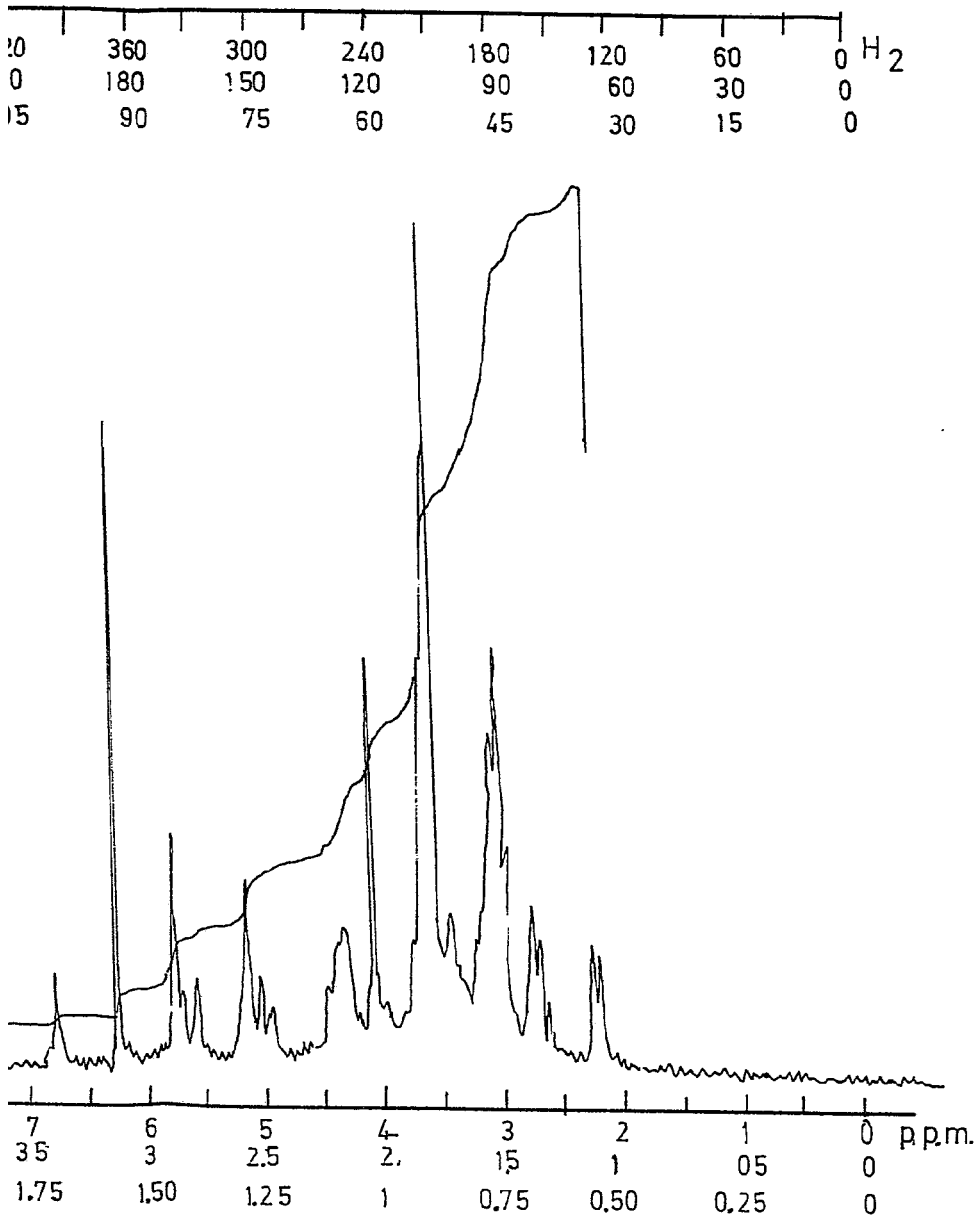
Madrid
SOLÍS ACEBO Y MOLEJ
Ejército, L. Casca Ferrández

FIG. 7

20	660	600	540	480	420	360	300
10	330	300	270	240	210	180	150
5	165	150	135	120	105	90	75



.7



ESCALA
VARIABLE

1 FEB. 1977

Madrid

GONZALEZ ACEBO Y MODEI
Dr. D. Fernando L. Garcia Fernández