



ESPAÑA

452.083

ES

11	NUMERO
21	452.083
22	FECHA DE PRESENTACION
	2-10-1976

A I

PATENTE DE INVENCION

P.-64.161

File:1574

60 PRIORIDADES:		
61 NUMERO	62 FECHA	63 PAIS
120009/75	3-10-75	Japón
120010/75	3-10-75	"
137391/75	14-11-75	"
11673/76	4-2-76	"

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	

64 TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE NOCARDICINA"

71 SOLICITANTE (S)

FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

No. 3, 4-Chome, Doshomachi, Higashi-ku, Osaka-shi, Japón

72 INVENTOR (ES)

Junji Hosoda, Hatsuo Aoki e Hiroshi Imanaka

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

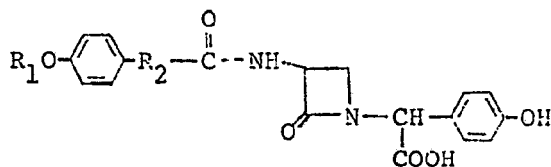
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ

1 Esta invención se refiere a un nuevo procedimiento para la producción de nuevos compuestos, Nocardicina C, D, E, F, y G.

5 De manera más particular, se refiere a un nuevo procedimiento para la producción de nuevos compuestos, Nocardicina C, D, E, F, y G mediante el cultivo de una Nocardicina C, D, E, F, y G - cepa productora que pertenece al género Nocardia, en un medio nutritivo.

10 De acuerdo con lo anterior, un objeto de esta invención es el de proveer nuevos compuestos, Nocardicina C, D, E, F, y G.

15 Los compuestos objeto de esta invención, Nocardicina C, D, E, F, y G (a los cuales se hace referencia más adelante en la presente como Nocardicinas) están representados por las fórmulas siguientes



Nocardicina	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>
25 C	$  \begin{array}{c}  \text{HOOC}-\text{CHCH}_2\text{CH}_2- \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{NH}_2 \\    \\  -\text{CH}-  \end{array}  $
D	"	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  -\text{C}-  \end{array}  $
30 E	H-	$  \begin{array}{c}  \text{N}-\text{OH} \\  \parallel \\  -\text{C}-  \end{array}  $

1	<u>Nocardicina</u>	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>
	F	H-	HO-N " -C-
5	G	"	NH <sub>2</sub> " -CH-

El microorganismo que se usa en esta invención es una cepa que pertenece al género Nocardia, que es capaz de producir la Nocardicina C, D, E, F, y/o G.

10           Entre estas cepas, se prefiere la Nocardia uniformis subsp. tsuyamanensis, que se depositó el 13 de junio de 1972, en la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) que tiene como dirección 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852, EUA, y que se le asignó el número ATCC 21806. Esta Nocardia uniformis subsp. tsuyama-  
 15           nensis ATCC 21806 depositada, se encuentra ahora a disposición del público y sus detalles, es decir, características microbiológicas, etc., se encuentran descritas en las literaturas, por ejemplo en la Patente de los Estados  
 20           Unidos N° 3.923.977 y la Solicitud de Patente Alemana 2242699.

          Debe quedar entendido que, para la producción de las presentes Nocardicinas, esta invención no se encuentra limitada al uso del microorganismo (específico)  
 25           que se describe en la presente, el cual sólo se proporciona con fines ilustrativos. Además, esta invención incluye asimismo el uso de mutantes naturales así como artificiales, que pueden ser derivados del microorganismo, según se describe en la presente de una manera convencional,  
 30           por ejemplo radiación con rayos X o Ultravioleta,

1 tratamiento con N'-nitro-N-nitrosoguanidina, 2-aminopurina o mostazas de nitrógeno, y similares.

5 Las Nocardinas de la presente se producen mediante el cultivo de una Nocardina C, D, E, F, y/o G, que producen cepas que pertenecen al género Nocardia tal como Nocardia uniformis subsp. tsuyamanensis en un medio nutritivo que contiene fuentes de nitrógeno y carbón asimilables bajo condiciones aeróbicas sumergidas. Además, como nutritivo del medio, se puede usar cualquiera de los  
10 nutritivos que se pueden utilizar por el microorganismo citado para la producción de las Nocardinas de la presente.

15 Las fuentes de carbón que se prefieren son los carbohidratos tales como glucosa, sucrosa, maltosa, glicerina, almidón y similares. Las fuentes de nitrógeno que se prefieren son las fuentes de nitrógeno orgánico tales como extractos de levadura, peptona, harina de gluten, harina de semilla de algodón, harina de frijol de soya, harina de maíz, levadura seca, extractos de carne, caseína hidrolizada, licor de maceración de maíz, urea y similares, y fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como sales de amonio (por ejemplo nitrato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, etc.) y similares.

25 Si se desea, se pueden añadir al medio, sales minerales tales como carbonato de calcio, fosfato de sodio o de potasio, cloruro o sulfato de magnesio y similares como componente menor. Además, se puede añadir al medio uno o más compuestos orgánicos tales como tirosina, glicina, serina, homoserina, p-hidroxifenilglicina, ácido alfa-aminobutírico, ácido alfa,beta-diaminopropiónico,  
30

1 N-acetiltirosina, N-acetiltirosinamida, ácido p-hidroxi-  
fenilpirúvico, ácido p-hidroxifenilglicólico, ácido p-  
hidroxifenilglioalico, ácido shiquímico, ácido 2-amino-3-  
5 (4-hidroxifenil)propionohidroxámico, 2-acetamido-3-(4-hi-  
droxifenil)propionohidrazida y similares. Estos compues-  
tos orgánicos pueden obrar como una clase de precursor y  
puede ser útil para elevar la productividad de las Nocar-  
dinas de la presente.

10 En el proceso de fermentación, las condiciones  
de cultivo aeróbico sumergido se usan de preferencia pa-  
ra la producción de las Nocardinas de la presente en  
cantidades masivas. Debe quedar entendido asimismo, que  
para la producción de cantidades limitadas, se puede u-  
15 sar un cultivo de sacudimiento o de superficie en un ma-  
traz o botella. Además, cuando el crecimiento se lleva a  
cabo en tanques grandes, se prefiere el uso de la forma  
vegetativa del organismo para inoculación en los tanques  
de producción, con el fin de evitar el crecimiento de re-  
trazo o retardado en el procedimiento para la producción  
20 de las Nocardinas de la presente. De acuerdo con lo ante-  
rior, es conveniente producir primero, un inóculo vegeta-  
tivo del organismo mediante la inoculación de una canti-  
dad relativamente pequeña del medio de cultivo con es-  
poras o micelios del organismo y cultivarlos y transfe-  
25 rir el inóculo vegetativo cultivado de una manera asépti-  
ca a los tanques grandes. El medio en el cual se produce  
el inóculo vegetativo, puede ser substancialmente igual  
o diferente del medio usado para la producción de las No-  
cardinas de la presente.

30 La agitación y aereación de la mezcla de culti-

1 vo se puede lograr de varias maneras. La agitación se  
puede proveer mediante un impulsor o equipo de agitación  
mecánica similar, revolviendo o sacudiendo el fermenta-  
dor, mediante varios equipos de bombeo o mediante el pa-  
5 so de aire estéril a través del medio. La aereación se  
puede llevar a cabo haciendo pasar aire estéril a través  
de la mezcla de fermentación. En el curso de la fermentación,  
en particular cuando el medio de cultivo es notablemente  
espumoso, se puede añadir al medio un agente  
10 desespumante tal como aceites de plantas (por ejemplo aceite  
de frijol de soya, etc.), alcoholes más altos (por ejemplo  
octadecanol, tetradecanol, etc.), siliconas y similares.

15 La fermentación se conduce habitualmente a una temperatura  
de entre aproximadamente 20°C y 40°C, de preferencia de  
aproximadamente 30°C, durante un período de 50 a 100 horas.

20 Las Nocardinas de la presente, como se han producido arriba,  
se pueden recuperar del caldo cultivado de una manera convencional,  
que por lo general se usa para la recuperación de productos  
fermentados, o de fermentación. Las Nocardinas de la presente  
se encuentran presentes en el caldo cultivado dentro del micelio  
(intracelularmente) y/o fuera del micelio (extracelularmente).  
25 te).

Según la primera etapa, el caldo cultivado está dividido en filtrado  
(supernatante) y pan de filtro por medio de filtración o centrifuga.

30 La extracción de las Nocardinas de la presente del pan de filtro,  
se lleva a cabo tratando este pan

1 con un disolvente orgánico en el cual las Nocardicinas  
de la presente pueden ser solubles, por ejemplo, alcoho-  
les (por ejemplo metanol, etanol, etc.), cetonas (por e-  
jemplo acetona, etc.), alcoholes acuosos (por ejemplo me-  
5 tanol acuoso, etanol acuoso, etc.) y similares.

Del filtrado y/o extracto obtenido de esta ma-  
nera, se pueden aislar y purificar las Nocardicinas de  
la presente, por medios convencionales.

10 Como estos medios convencionales, se pueden  
ejemplificar, tratamiento con adsorbentes (por ejemplo  
carbón activado, ácido silícico, gel de sílice, alúmina,  
etc.), resinas de intercambio aniónico o catiónico, o re-  
sinas de adsorción no iónicas macroporosas (por ejemplo  
15 Amberlite XAD-2, XAD-4, XAD-7 y XAD-8 (marca comercial,  
manufacturadas por Rohm & Haas Co.), Diaion HP10, HP20,  
HP30, HP40 y HP50 (marca comercial, manufacturada por  
Mitsubishi Chemical Industries Ltd.), etc./; extracción  
con disolvente; concentración bajo presión reducida; lio-  
filización; ajuste de pH; cristalización; recristaliza-  
20 ción; y similares. Estos medios se pueden usar, de pre-  
ferencia, independientemente o en combinación de los mis-  
mos en orden opcional o de manera repetida.

Las Nocardicinas de la presente, producidas  
en el caldo de cultivo, se pueden aislar en la forma li-  
25 bre, y opcionalmente, en la forma de sus sales de metal  
alcalino mediante tratamiento del material crudo que con-  
tiene las Nocardicinas con un material de metal alcalino  
(por ejemplo hidróxido de sodio o de potasio) durante  
los procedimientos de aislamiento o purificación.

30 Las Nocardicinas de la presente obtenidas en

1 su forma libre, se puede convertir asimismo a la sal con  
una base orgánica o inorgánica (por ejemplo hidróxido de  
potasio o de sodio, etanolamina, dicitclohexilamina, etc)  
de una manera convencional.

5 Además, la sal de base inorgánica u orgánica  
de las Nocardinas de la presente, se puede convertir  
fácilmente a su forma libre mediante tratamiento de la  
sal con un ácido tal como un ácido mineral (por ejemplo  
ácido clorhídrico, etc.), de una manera convencional.

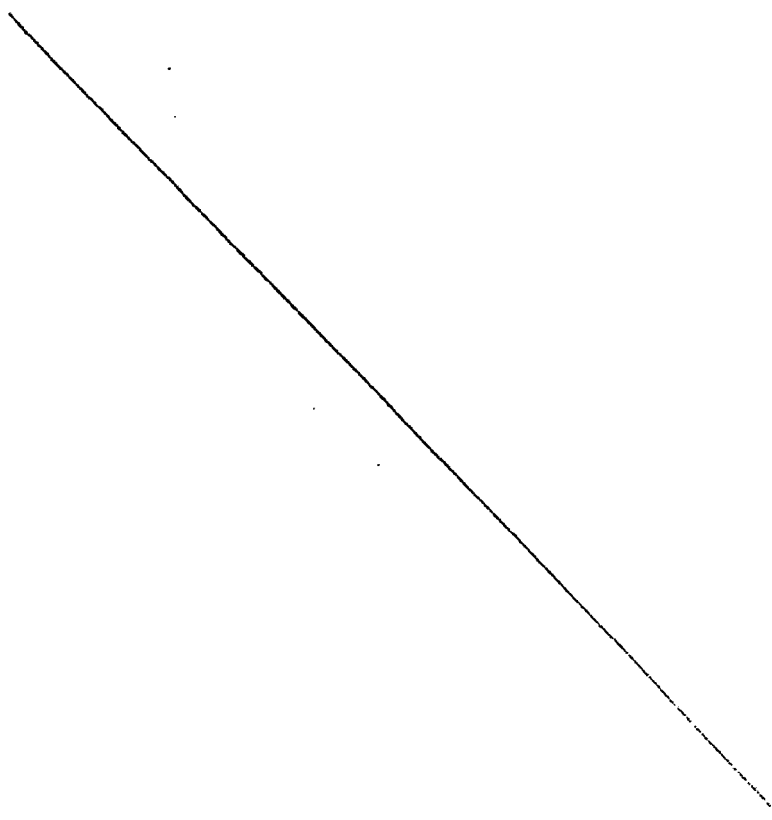
10 Se mencionan a continuación las propiedades  
físico-químicas de las Nocardinas de la presente.

15

20

25

30



1 Tabla 1.- Propiedades Fisicoquímicas de la Nocardicina

		C y D	
		Nocardicina C	Nocardicina D
5	Aspecto	Cristales blancos Amfotérico	Cristales blancos Amfotérico
10	Rotación óptica	$\alpha_D^{24} = -95^\circ$ (C=0,6, H <sub>2</sub> O)	$\alpha_D^{20} = -171^\circ$ (C=1, H <sub>2</sub> O)
	Punto de fusión	220-225°C (desc)	230-235°C (desc)
15	Espectro UV	Lambda max (E <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup> ) = 227(434),  272(43, 277(sh, 37)nm en H <sub>2</sub> O,	Lambda max (E <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup> ) = 226(395)  298(313)nm en C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH-H <sub>2</sub> O (1:1),
20		232(319), 243 (sh, 289), 280 (54), 292 (sh,44) nm en NaOH ac. 0,1N	246(305), 298(300)nm en C H OH-O,1N ac. NaOH (1:1)
25	Espectro IR	Gamma <sub>max</sub> <sup>nujol</sup> = 3430, 2920, 2850, 1745, 1670, 1610, 1580, 1560, 1515, 1465, 1375, 1340, 1310, 1255, 1180, 1170,	Gamma <sub>max</sub> <sup>nujol</sup> = 3430, 3210, 2900, 1850, 1735, 1670, 1655, 1610, 1600, 1570, 1510, 1465, 1455, 1420, 1408, 1375, 1340, 1320, 1280, 1260, 1240, 1178,
30			

## 1 Tabla 1 (cont.)

	Nocardicina C	Nocardicina D
5	1110, 1040, 970, 940, 930, 890, 850, 820, 795, 760, 740, 680 cm <sup>-1</sup>	1140, 1120, 1080, 1050, 1030, 1010, 980, 930, 845 cm <sup>-1</sup>
10	Reacción de color Positiva: ninhidrina y cloruro férrico, reacciones	Positiva: reacciones ninhidrina y cloruro férrico
15	Negativa: Pruebas de Ehrlich y Molisch, reacción con reactivo de Tollens	Negativa: pruebas de Molisch, reacciones con reactivo de Tollens y reactivo de Dragendorff
20	Solubilidad	
25	Altamente soluble: solución alcalina acuosa (por ejemplo amoníaco acuoso, hidróxido de sodio acuoso, en solución), sulfóxido de dimetilo	Altamente soluble: solución alcalina acuosa (por ejemplo amoníaco acuoso, solución de hidróxido de sodio acuoso), piridina Escasamente soluble: H <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> OH, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH
30		

## 1 Tabla 1 (cont.)

	Nocardicina C	Nocardicina D
5 Spo	Escasamente soluble: H <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> OH Insoluble: C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> , CHCl <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Insoluble: CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , CHCl <sub>3</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

## 10 Tabla 2.- Propiedades fisicoquímicas de Nocardicina E y F

	Nocardicina E	Nocardicina F
15 Aspecto	Cristales blancos Débilmente ácido	Cristales blancos Débilmente ácido
Analisis elemental	C56,95:H4,20:N10,48	C56,84:H4,35:N10,23
20 Rotación óptica	$\alpha_D^{24} = -192^\circ$ (C=1, H <sub>2</sub> O)	$\alpha_D^{24} = -181^\circ$ (C=1, H <sub>2</sub> O)
Punto de fusión	228-231°C (desc)	230-231°C (desc)
25 Espectro UV	Lambda max (E <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup> ) = 222(sh, 557), 272(396)nm en CH <sub>3</sub> OH 248(719), 298(324)nm en CH <sub>3</sub> OH-NaOH ac. 1N (9:1)	Lambda max (E <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup> ) = 242(516, 270(248)nm en CH <sub>3</sub> OH, 247(720), 295(253)nm en CH <sub>3</sub> OH-NaOH ac. 1N (9:1)
30		

## 1 Tabla 2 (cont.)

	Nocardicina E	Nocardicina F
5	Espectro IR	Gamma <sub>max</sub> <sup>nujol</sup> = 3380,
		Gamma <sub>max</sub> <sup>nujol</sup> = 3420, 3300,
	3280, 2920, 2840,	3280, 2950, 2920, 1900,
	1745, 1675, 1645,	1745, 1680, 1655, 1610,
	1610, 1595, 1540,	1595, 1550, 1515, 1465,
	1515, 1510, 1460,	1450, 1410, 1380, 1360,
10	1435, 1375, 1360,	1310, 1295, 1280, 1270,
	1325, 1310, 1275,	1250, 1220, 1180, 1140,
	1260, 1220, 1175,	1120, 1110, 1060, 1030,
	1140, 1115, 1105,	1010, 980, 935, 900,
	1055, 1030, 1005,	870, 860, 840, 820,
15	945, 935, 910,	780, 740, 720, 680,
	855, 845, 825,	cm <sup>-1</sup>
	755, 735, 730,	
	700, 685 cm <sup>-1</sup>	
20	Reacción de color Positiva: reac-	Positiva: reacción de
	cción de cloruro	cloruro férrico-ferri-
	férrico-ferricia	cianuro de potasio
	nuro de potasio	Negativa: prueba de
	Negativa: prueba	Ehrlich, reacción de
	de Ehrlich, reac	ninhidrina
25	ción de ninhidrina	
	Solubilidad	Altamente soluble: so-
	Altamente soluble: so-	lución alcalina acuosa,
	lución alcalina acuosa,	lución alcalina acuosa,
	acuosa (por ejem-	piridina, sulfóxido de
30	plo amoníaco acuoso	dimetilo

1 Tabla 2 (cont.)

	Nocardicina E	Nocardicina F
5	solución de hidróxi- do de sodio acuoso)	Escasamente soluble: C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH,
	piridina, sulfóxido de dimetilo,	Insoluble: CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , CHCl <sub>3</sub>
10	Escasamente soluble: CH <sub>3</sub> OH, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, Insoluble: CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , CHCl <sub>3</sub>	

Tabla 3.- Propiedades fisicoquímicas de Nocardicina G

	Nocardicina G
15	
Aspecto	Cristales blancos Amfotérico
20 Análisis elemental	C57,62; H5,14; N10,39; H <sub>2</sub> O 2,81
Rotación óptica	$\alpha_D^{24} = -205^\circ$ (C=1, NaHCO <sub>3</sub> ac. 1%)
25 Punto de fusión	227 - 233°C (desc) (La Nocardicina G se cambia gradualmente a rojo aproximadamente a 200°C y negro rojizo a aproximadamente 225°C)
30 Espectro UV	Lambda max (E <sub>1</sub> <sup>1%</sup> <sub>cm</sub> ) = 228(454, 273(52),

1	Tabla 3 (cont.)	
		Nocardicina G
5		278(3h, 45)nm en HCl ac. 0,1N, 248(562), 291(107)nm en NaOH ac. 0,1N.
10	Espectro IR	Gamma <sub>max</sub> nujol = 3250, 3150, 2900, 2850, 1745, 1690, 1610, 1590, 1560, 1510, 1460, 1375, 1340, 1295, 1270, 1255, 1185, 1170, 1135, 1100, 1050, 1025, 940, 925, 880, 850, 830, 825, 815, 760, 750, 720, 680 cm <sup>-1</sup>
15	Reacción de color	Positiva: reacciones de ninhidrina y cloruro férrico  Negativa: pruebas de Ehrlich y Molisch, reacción de Fehling, y reac- ción con reactivo de Tollens
20	Solubilidad	Altamente soluble: sulfóxido de dimeti- lo, H <sub>2</sub> O Escasamente soluble: CH <sub>3</sub> OH, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH Insoluble: CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , CHCl <sub>3</sub>
25		
30		

Tabla 4.- Cromatografía de Capa Delgada de Nocardicinas C, D, E, F y G

Portador : Eastman Chromagram Sheet Cellulose Nº 6065  
(que contiene agente fluorescente)

(Marca Comercial de Eastman Kodak Co.)

Detección : método de absorción UV

Disolvente revelador	Valor Rf				
	Nocardicina C	Nocardicina D	Nocardicina E	Nocardicina F	Nocardicina G
n-butanol-ácido acético					
co-agua (4:1:2)	0,38	0,57	0,84	0,89	0,62
n-butanol saturado					
con agua	0,00	0,04	0,29	0,41	0,15
n-propanol-agua					
(7:3)	0,31	0,48	0,67	0,74	0,55

POOR  
QUALITY

Tabla 5.- Espectro RMN de los Nocardinas I, F y G

Nocardina	E	F	G
Disolvente	DMSO-d <sub>6</sub>	DMSO-d <sub>6</sub>	KaCO <sub>3</sub> -D <sub>2</sub> O soluc.
Forma interna	TMS	TMS	2,2,3,3-tetra deuterio-3 -(trimetil silil)pro- pionato de sodio
delta ppm	3,12 (1H,m) 3,79 (1H,t,J=5Hz) 4,98 (1H,m) 5,33 (1H,s) 6,76 (4H,d,J=6Hz) 7,16 (2H,d,J=6Hz)	3,14 (1H,m) 3,74 (1H,t,J=5Hz) 4,94 (1H,m) 5,31 (1H,s) 6,76 (4H,d,J=6Hz) 7,17 (2H,d,J=6Hz)	ca. 3,00 (1H,m) 3,77 (1H,t,J=5Hz) 5,06 (1H,s) 5,32 (1H,s) 6,65 (2H,d,J=6Hz) 6,69 (2H,d,J=6Hz)

POOR QUALITY

Tabla 5.- (Continúa de la página anterior)

Nocardicina	E	F	G
	7,30 (2H, d, J=8Hz)	7,39 (2H, d, J=8Hz)	7,25 (4H, d, J <sub>AB</sub> =8)
	9,06 (1H, d, J=8Hz)	8,82 (1H, d, J=8Hz)	
	9,70 (3H, s amplio)	11,60 (1H, s amplio)	
	11,14 (1H, s)		

1            Como resultado de un estudio adicional, las es-  
estructuras químicas de las Nocardinas de la presente,  
que tienen las propiedades fisicoquímicas anteriores, han  
sido identificadas y designadas como se ha mencionado  
5            arriba.

Las Nocardinas de la presente y sus sales po-  
seen espectros antibióticos específicos, que muestran ac-  
tividad contra bacterias patogénicas con baja toxicidad.  
De acuerdo con lo anterior, las Nocardinas de la pre-  
10            sente y sus sales se pueden usar en el tratamiento de en-  
fermedades infecciosas causadas por esas bacterias en los  
mamíferos.

Las pruebas farmacológicas de algunas de las  
Nocardinas de la presente, es decir, pruebas antimicro-  
bianas y de toxicidad, se mencionan a continuación.

15            Concentración Inhibitoria Mínima (C.I.M.)

Se llevó a cabo la prueba de C.I.M. por medio  
del método de dilución de agar en serie habitual, usando  
agar de infusión de corazón (o agar Mueller Hinton), que  
20            se incubó a 37°C durante 20 horas. El valor de la C.I.M.  
se expresó como la concentración mínima de las Nocardici-  
nas C, D, E, ó F (mcg/ml) que exhibe el crecimiento de  
los microorganismos. Los resultados se muestran en la Ta-  
25            bla 6 siguiente.

Tabla 6.- Concentración Inhibitoria Mínima

Microorganismo de prueba	C.I.M. (mcg/ml)					
	Nocardicina C*	Nocardicina D**	Nocardicina E***	Nocardicina F***	Nocardicina G***	Nocardicina H***
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	800	800	400	400	400	400
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	200	200	400	400	400	400
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	400	50	400	400	400	400
<i>Elebsiella pneumoniae</i> NCTC418	-	100	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> IAM1025	400	12,5	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> 1891	-	50	-	-	-	-

Tabla 6.- (Continúa de la página anterior)

Microorganismo de prueba	C.I.K. (mcg/ml)			
	Nocardicina	Nocardicina	Nocardicina	
	C*	D**	E***	
			F****	
Pseudomonas aeruginosa NCTC10490	50	800	12,5	100
Shigella dysenteriae A-1	-	50	-	-

Nota) \* sobre agar de infusión de corazón (10<sup>6</sup> células/ml)  
 \*\* sobre agar de infusión de corazón (10<sup>8</sup> células/ml)  
 \*\*\* sobre agar Mueller Hinton (10<sup>6</sup> células/ml)

1 Toxicidad aguda

5 Una solución de hidróxido de sodio acuoso (pH 7,4) de Nocardicina C se inyectó intravenosamente a cada uno de cinco ratones macho cepa ICR que pesaban de 18 a 22 gramos (Dosis: 1 g/Kg), y se continuó la observación durante una semana después de esta administración, como resultado de lo cual todos los ratones probados fueron normales durante este período.

10 Además, cada una de las soluciones de hidróxido de sodio acuoso (pH 7,4) de las Nocardicinas D, E, F, o G, se inyectó subcutáneamente en cada uno de cinco ratones cepa ICR que pesaban de 18 a 22 gramos (Dosis: 500 miligramos/Kilogramo) y se continuó la observación durante una semana después de la administración, como resultado de lo cual, todos los ratones probados fueron normales durante este período.

15 Las Nocardicinas y sus sales farmacéuticamente aceptables de la presente, se pueden formular para administración en cualquier forma conveniente, análogamente con antibióticos conocidos, mediante mezcla con un portador farmacéutico.

20 Una sal farmacéuticamente aceptable de las Nocardicinas de la presente puede incluir sal con una base orgánica o inorgánica tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, amoníaco, etanolamina, trietilamina, dicitclohexilamina y similares.

25 Así pues, la composición antimicrobica se puede usar en la forma de una preparación farmacéutica, por ejemplo, en forma sólida, semisólida o líquida, que contenga el compuesto objeto activo en mezcla con un porta-

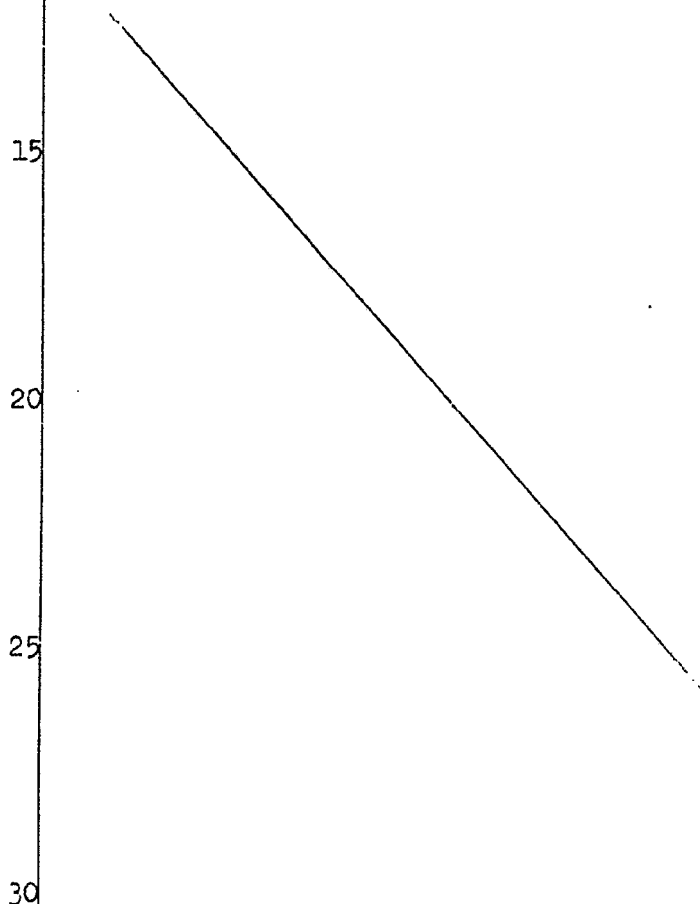
30

1 dor o excipiente farmacéutico orgánico o inorgánico ade-  
cuado para aplicaciones externas, internas o parentera-  
les. El ingrediente activo puede estar compuesto, por  
ejemplo, con los portadores habituales para tabletas,  
5 píldoras, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones,  
suspensiones y otras formas adecuadas para el uso. Los  
portadores que se pueden usar son agua, glucosa, lactosa,  
goma de acacia, gelatina, manitol, pasta de almidón, tri-  
silicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina,  
10 sílice coloidal, almidón de patata, urea y otros porta-  
dores adecuados para uso en la producción de las prepara-  
ciones, en forma sólida, semisólida o líquida, y además  
de auxiliares, estabilizadores, espesadores y colorantes  
y perfumes. Las composiciones antimicrobianas pueden con-  
15 tener asimismo agentes preservativos o bacteriostáticos  
con lo que se mantiene el ingrediente activo en las pre-  
paraciones deseadas estable en actividad. Las Nocardici-  
nas de la presente o sus sales se incluyen en las compo-  
siciones antimicrobiales en una cantidad suficiente para  
20 producir el efecto terapéutico deseado sobre el proceso  
o condición bacteriamente infectado.

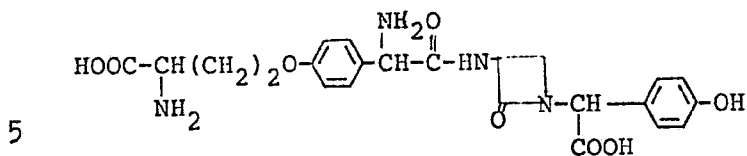
Para la aplicación de la composición antimicro-  
bial de la presente a los seres humanos, se prefiere apli-  
carla en una forma de inyección intravenosa o intramuscu-  
25 lar. Si bien la dosificación o cantidad terapéuticamente  
activa de las Nocardinas de la presente o sus sales,  
varía de y depende asimismo de la edad y condición de ca-  
da paciente individual que se va a tratar, por lo general  
una dosis diaria de aproximadamente 2 a 50 miligramos de  
30 ingrediente activo/Kilogramo de ser humano o animal, se

1 administra para el tratamiento de las enfermedades.

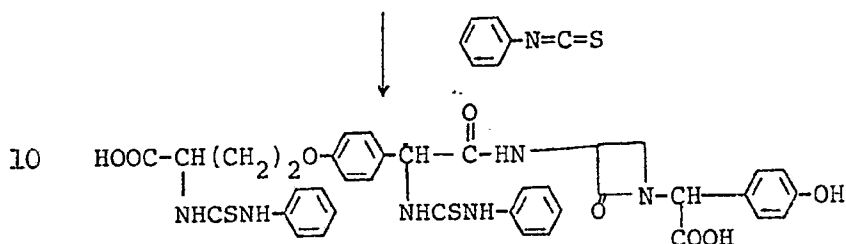
Las Nocardinas de la presente se pueden usar  
asimismo como intermedios para la preparación de otra 3-  
5 acilamino-1-(alfa-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-azetidino-  
na, que es mejor en la actividad antimicrobial contra  
las bacterias Gram-positiva patogénicas. Como referen-  
cia, con respecto a algunas de las Nocardinas de la pre-  
sente, se ilustra la producción de la 3-acilamino-1-(al-  
fa-carboxi-4-hidroxi-bencil)-2-azetidina a partir de  
10 las Nocardinas de la presente mediante el esquema que  
sigue.



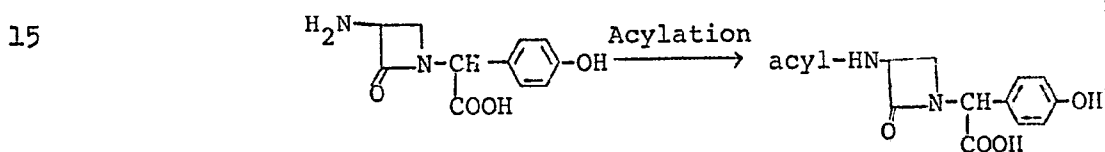
1



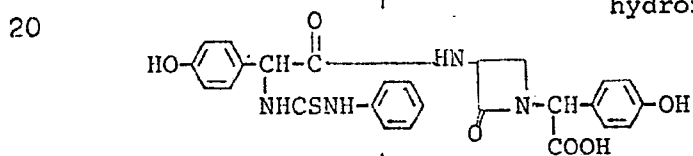
(Nocardicin C)



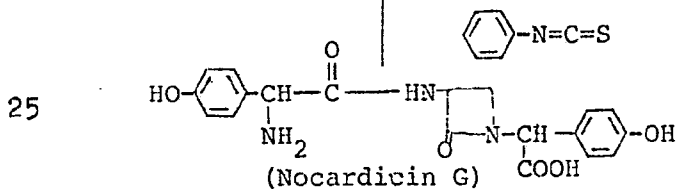
Hydrolysis



(3-acylamino-1-( $\alpha$ -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinone)



Hydrolysis



30

1                    Se proporcionan los ejemplos siguientes con el fin de ilustrar esta invención

Ejemplo 1 (Producción de Nocardicina C)

5                    Un medio acuoso (100 ml) que contenía 2% de sucrosa, 2% de harina de semilla de algodón, 1% de levadura seca, 2,18% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1,43% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , se vertió en cada uno de veinte matraces de sacudir de 500 ml, y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos. Se inoculó un poco de un cultivo al sesgo de Nocardia uniformis subsp. tsuyamanensis ATCC 21806 en cada uno de los  
10                    medios, y luego se cultivó a 30°C durante 48 horas.

15                    Por otra parte, otro medio acuoso (100 litros) que contenía 2% de almidón soluble, 1% de peptona, 0,4% de extractos de levadura, 1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,5% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% de L-tirosina y 0,1% de glicina se ajustó a un pH de 6,0 con solución de hidróxido de sodio acuoso. Se vertieron 20 litros del medio en cada uno de cinco fermentadores de 30 litros, y se esterilizaron a 120°C durante minutos.

20                    Se añadió entonces, a cada uno de los medios, el cultivo inoculado, como se preparó anteriormente, en una cantidad de 2% por volumen del medio. El organismo se desarrolló a 30°C durante 96 horas. Durante el período de desarrollo, el caldo se agitó a 250 r.p.m. y se so-  
25                    pló aire estéril a través del caldo en una cantidad de 20 litros por minuto.

30                    El caldo cultivado resultante (80 litros) se filtró con el auxilio de tierra diatomácea (8 Kg) para dar el pan de filtro y el filtrado. Al pan de filtro se añadió 70% de etanol acuoso (20 litros), y luego la mez-

1 cla se agitó durante una hora y se filtró. Los extractos combinados (40 litros) se concentraron a un volumen de 2 litros bajo presión reducida.

5 Por otra parte, el filtrado del cultivo, según se preparó anteriormente, se concentró a un volumen de 10 litros. Se añadió entonces al concentrado, 50 litros de metanol con agitación, tras de lo cual la mezcla se dejó reposar durante una hora y luego se filtró. El filtrado se concentró a un volumen de 2 litros bajo presión reducida.

10 El concentrado combinado se ajustó a pH de 3,0 con ácido clorhídrico 6N y se extractó dos veces con acetato de etilo (4 litros). La capa acuosa se concentró a un volumen de 1,8 litros bajo presión reducida. El concentrado se ajustó a un pH de 4,0 con solución de hidróxido de sodio acuoso y luego se hizo pasar a través de una columna empacada con Diaion HP20 (4 litros) para dar una solución pasada. Subsecuentemente, la columna se lavó con agua para dar los lavados. La solución pasada y los lavados se combinaron y la solución acuosa (6 litros) se ajustó a pH de 8,0 con solución de hidróxido de sodio acuoso 6N. Se añadió a la solución entonces, carbón activado (120 g), tras de lo cual la mezcla se agitó durante 10 minutos y luego se filtró. El carbón activado se lavó con agua (1 litro) y luego se le añadieron 80% de metanol (1 litro).

25 La mezcla se agitó durante 10 minutos y se filtró. La operación de elución se repitió una vez más. El eluato combinado (2 litros) se concentró a un volumen de 10 ml. Se añadió metanol (200 ml) al concentrado con

30

1 agitación y los materiales insolubles se filtraron de la  
mezcla. El filtrado se concentró a un volumen de 10 ml.  
El concentrado se sometió a cromatografía de columna so-  
bre celulosa [disolvente de revelado: capa superior de  
5 una mezcla de n-butanol:ácido acético: agua (100:5:30)].  
El eluato (500 ml), que contenía el compuesto objeto, se  
recogió. Se añadió entonces al eluato, 500 ml de n-hexa-  
no, y la mezcla se agitó y luego se separó la capa acuosa.  
Se añadió acetato de etilo (100 ml) a la capa acuosa,  
10 y la mezcla se agitó. La capa acuosa se separó y se con-  
centró a un volumen de 20 ml. Se añadió al concentrado  
acetona (40 ml), y la mezcla se dejó reposar en un refri-  
gerador, y los cristales obtenidos se secaron para dar  
la Nocardicina C (26 mg) en la forma de cristales crudos).  
15 Estos cristales crudos se disolvieron en agua (4 ml) y se  
añadió acetona (8 ml) a la solución. La mezcla se dejó  
reposar para dar cristales, que se separaron y se seca-  
ron para dar Nocardicina C (15 mg) en la forma de crista-  
les blancos.

20

#### Ejemplo 2 (Producción de Nocardicina D)

Un medio acuoso (100 ml), que contenía 2% de  
sucrosa, 2% de harina de semilla de algodón, 1% de leva-  
dura seca, 2,18% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1,43% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , se  
25 vertió en cada uno de veinte matraces de sacudir de 500  
mililitros, y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos.  
Un poco de cultivo al sesgo de Nocardia uniformis subsp.  
tsuyamanensis ATCC 21806 se inoculó en cada uno de los  
medios, y se cultivó a 30°C durante 48 horas.

30

Por otra parte, un medio acuoso (100 litros)

1 que contenía 2% de almidón soluble, 1% de peptona, 0,4%  
de extractos de levadura, 1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot$   
5  $12\text{H}_2\text{O}$ , 0,5% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% de L-tirosina y 0,1% de  
glicina, se ajustó a pH de 6,0 con solución de hidróxi-  
do de sodio acuoso, y se vertieron 20 litros del medio  
en cada uno de cinco fermentadores agitados y se esteri-  
lizó a 120°C durante 20 minutos.

Se añadió, a cada uno de los medios, el cultivo  
inoculado, preparado anteriormente, en una cantidad de  
10 2% por volumen del medio. El organismo se desarrolló a  
30°C durante 96 horas. Durante el período de desarrollo,  
el caldo se agitó a 250 r.p.m. y se hizo pasar aire es-  
téril en el caldo, en una cantidad de 20 litros por minu-  
to.

15 Se añadió al caldo cultivado resultante (80 li-  
tros), tierra diatomácea (8 Kg), y luego la mezcla se fil-  
tró para dar el filtrado y el pan de filtro. El filtrado  
(70 litros), se concentró bajo presión reducida hasta un  
volumen de 7 litros. Se añadió metanol al concentrado  
20 (90 litros) con agitación, y luego la mezcla se dejó re-  
posar durante una hora y se filtró para eliminar los pre-  
cipitados. El filtrado (80 litros), se concentró a un  
volumen de 5 litros. Se añadió agua al concentrado (15  
litros) y carbón activado (1 Kg).

25 La mezcla se agitó durante 10 minutos y se fil-  
tró para recoger el carbón activado. Se añadió al carbón  
activado, 80% de metanol acuoso (10 litros), y luego la  
mezcla se ajustó a un pH de 8,0 con 5% de amoníaco acuo-  
so, se agitó durante 10 minutos y se filtró. Esta elución  
30 se repitió una vez más. Los filtrados combinados se con-

1 centraron bajo presión reducida a un volumen de 2 litros.  
El concentrado se ajustó a pH de 4,0 con ácido clorhídri-  
co 6N y se hizo pasar a través de una columna empacada  
5 con Diaion HP 20 (4 litros). Esta columna se lavó con a-  
gua (4 litros), tras de lo cual el compuesto objeto se  
eluyó con etanol acuoso 50%. El eluato (1,5 litros) que  
contenía el compuesto objeto se recogió y concentró ba-  
jo presión reducida a un volumen de 100 ml. El concentra-  
do se sometió a cromatografía de columna sobre celulosa  
10 (disolvente de revelado: n-butanol saturado con agua).  
El eluato (200 ml) que contenía el compuesto objeto se  
recogió y concentró bajo presión reducida a un volumen  
de 10 ml. El concentrado se sometió adicionalmente a cro-  
matografía de columna sobre celulosa (disolvente de reve-  
15 lado: capa superior de una mezcla de acetato de etilo:n-  
butanol:agua (5:5:2)/. El eluato (100 ml) que contenía  
el compuesto objeto se concentró bajo presión reducida  
a un volumen de 10 ml para dar precipitados, que se se-  
pararon por filtración y luego se secaron. Los precipi-  
20 tados se suspendieron en agua (5 ml), tras de lo cual la  
suspensión se ajustó a pH de 8,0 con solución de hidró-  
xido de sodio acuoso 1N para disolver el precipitado. La  
solución se ajustó a pH de 3,0 con ácido clorhídrico 1N  
y se dejó reposar durante la noche en un refrigerador  
25 (5°C) para dar cristales, que se separaron mediante fil-  
tración, y luego se secaron para dar Nocardicina D (50  
mg) en la forma de cristales blancos.

El pan de filtro que contenía los micelios, a-  
rriba obtenido, se extractó dos veces con etanol acuoso  
30 al 70% (20 litros). Los extractos combinados se concen-

1 traron bajo presión reducida a un volumen de 2 litros.  
El concentrado se ajustó a pH de 3,0 con ácido clorhídri-  
co 6N y se extractó tres veces con acetato de etilo (2  
litros) para eliminar las impurezas. La capa acuosa se  
5 separó y concentró bajo presión reducida. El concentra-  
do se ajustó a pH de 4,0 con solución de hidróxido de so-  
dio acuoso 6N y se hizo pasar a través de una columna em-  
pacada con Diaion HP20 (2 litros). La columna se lavó con  
agua, después, el compuesto objeto se eluyó con etanol  
10 al 50% (1,5 litros). El eluato (1,5 litros) se concentró  
bajo presión reducida a un volumen de 100 ml. El residuo  
obtenido se sometió a cromatografía de columna sobre ce-  
lulosa (disolvente de revelado: n-butanol saturado con a-  
gua). El eluato que contenía el compuesto objeto se reco-  
15 gió y concentró bajo presión reducida. El residuo obte-  
nido se sometió a cromatografía de columna sobre celulo-  
sa (disolvente de revelado: capa superior de la mezcla  
de acetato de etilo:n-butanol:agua (5:5:2) ). El eluato  
que contenía el compuesto objeto se concentró bajo pre-  
20 sión reducida a un volumen de 10 ml para dar los precipi-  
tados, que se separaron por filtración y se secaron. Los  
precipitados se suspendieron en agua (2 ml) y se ajusta-  
ron a pH de 8,0 con solución de hidróxido de sodio acuo-  
so 1N para disolver los precipitados. A continuación, la  
25 solución se ajustó a pH de 3,0 con ácido clorhídrico 1N  
y se dejó reposar durante la noche en un refrigerador  
(5°C) para dar cristales, que se separaron por filtra-  
ción y se secaron para dar Nocardicina D (10 mg) en la  
forma de cristales blancos.

1 Ejemplo 3 (Producción de Nocardicina E)

5 Un medio acuoso (300 ml), que contenía 2% de sucrosa, 2% de harina de semilla de algodón, 1% de levadura seca, 2,18% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1,43% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en un litro, mejor dicho, en un matraz de Erlenmeyer de un litro y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos. Se ino-  
10 culó cultivo al sesgo de Nocardia uniformis subsp. tsuyamanensis ATCC 21806 en el medio, y se cultivó a 30°C durante 54 horas.

15 Se colocó, en un fermentador de 500 litros, el mismo medio (150 litros) arriba mencionado. El medio de fermentación se esterilizó a 120°C durante 20 minutos y luego se inoculó con el volumen total del inóculo vegetativo arriba preparado, y se cultivó a 30°C durante 42 horas.

20 Por otra parte, un medio acuoso (3000 litros) que contenía 2% de algodón soluble, 1% de peptona, 0,4% de extractos de levadura, 1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,5% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% de L-tirosina y 0,1% de glicina, se vertió en un fermentador de 4000 litros y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos. El volumen total del caldo cultivado, arriba preparado, se inoculó en el medio.

25 El organismo se desarrolló en el medio de fermentación a 30°C durante 119 horas. Durante el período de desarrollo, el caldo se agitó a 230 r.p.m. y se hizo pasar aire estéril a través del caldo en una proporción de 3000 litros por minutos. Tras de que el cultivo se  
30 hubo terminado, el caldo cultivado se filtró con el auxilio de tierra diatomácea (180 Kg). A una parte del filtra-

1 do (1500 litros), se añadió carbón activado (45 Kg), tras  
de lo cual la mezcla se agitó durante 30 minutos y se  
filtró para separar el carbón activado. Se añadió al car-  
bón activado una mezcla de acetona y agua (7:3) (200 li-  
5 tros), tras de lo cual la mezcla resultante se ajustó a  
pH de 8,0 con amoníaco acuoso y se agitó durante 60 mi-  
nutos. El eluato (500 litros) así obtenido, se concentró  
a un volumen de 50 litros. El concentrado se ajustó a pH  
de 4,0 con ácido clorhídrico 6N. En seguida, se añadió  
10 al concentrado n-butanol (60 litros), tras de lo cual la  
mezcla se agitó durante 30 minutos. La capa de n-butanol  
(50 litros) se separó y concentró bajo presión reducida  
a un volumen de 10 litros. El concentrado se ajustó a  
pH de 8,0 con amoníaco acuoso al 5% y se agitó durante  
15 30 minutos. La capa acuosa (15 litros) se separó y con-  
centró bajo presión reducida a un volumen de 1,3 litros.  
El concentrado se ajustó a pH de 4,0 con ácido clorhídri-  
co 6N, se mezcló con tierra diatomácea (1,3 Kg) y luego  
se secó. El polvo se lavó con cloroformo (3 litros) y el  
20 compuesto objeto se eluyó con acetato de etilo. El elua-  
to (5 litros) se concentró bajo presión reducida a un vo-  
lumen de 50 ml. El concentrado se mezcló con tierra dia-  
tomácea (50 g) y se secó. El polvo se sometió a cromato-  
grafía de columna sobre ácido silícico (disolvente de re-  
25 velado: acetato de etilo). El eluato (600 ml) se concen-  
tró bajo presión reducida a un volumen de 10 ml. El con-  
centrado se mezcló con tierra diatomácea (10 g) y se se-  
có. El polvo se sometió a cromatografía de columna sobre  
ácido silícico [disolvente de revelado: una mezcla de  
30 cloroformo:metanol (100:7)]. El eluato (200 ml) se con-

1 centró bajo presión reducida, a un volumen de 3 mililitros.  
Subsecuentemente, el concentrado se mezcló con tierra dia-  
tomácea (3 g) y se secó. El polvo se sometió a cromato-  
5 grafía sobre ácido silícico /disolvente de revelado: una  
mezcla de cloroformo: acetato de etilo (1:4)/. El eluato  
(50 ml), se evaporó a la sequedad bajo presión reducida.  
El residuo así obtenido se disolvió en metanol (1 mililitro).  
A la solución se añadió cloroformo (5 ml), y se dejó  
10 reposar durante la noche a 4°C para dar cristales  
(230 mg), que se recrystalizaron de una mezcla de meta-  
nol y cloroformo (1:5) (12 ml) para dar Nocardicina E  
(190 miligramos) en la forma de cristales blancos.

#### Ejemplo 4 (Preparación de Nocardicina F)

15 Un medio acuoso (100 ml) que contenía 2% de su-  
crosa, 2% de harina de semilla de algodón, 1% de levadu-  
ra seca, 2,18% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,43% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  se ver-  
tió en cada uno de veinticuatro matraces Sakaguchi de 500  
ml y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos. Cultivo al  
20 sesgo de Nocardia uniformis subsp. tsuyamanensis ATCC  
21806 y el organismo se cultivaron a 30°C durante 48 ho-  
ras.

Por otra parte, un medio acuoso (20 litros) que  
contenía 2% de almidón soluble, 1% de peptona, 0,4% de  
25 extractos de levadura, 1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  
0,5% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% de L-tirosina y 0,1% de glicina  
se vertió en cada uno de seis fermentadores con agitación  
de 30 litros y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos.  
A continuación, el caldo cultivado, según arriba obteni-  
30 do, se inoculó en cada uno de los medios en una propor-

1 ción de 2% por volumen del medio. El organismo se desar-  
rolló en el medio a 30°C durante 96 horas.

5 Durante el período de desarrollo, el caldo se  
agitó a 250 r.p.m. y se hizo pasar aire estéril a través  
del caldo en una proporción de 20 litros por minuto. Des-  
pués que se hubo completado el cultivo, el caldo cultiva-  
do (100 litros) se filtró con la ayuda de tierra diatomá-  
cea (10 kg). Se añadió entonces al filtrado (90 litros),  
carbón activado (1,5 Kg), tras de lo cual la mezcla se  
10 agitó durante 10 minutos y luego se filtró. El carbón  
cultivado se lavó dos veces con agua (10 litros) y el  
compuesto objeto se eluyó con metanol acuoso al 80% (30  
litros) (y 20 litros). El eluato, (50 litros), se concen-  
15 tró bajo presión reducida a un volumen de 6 litros. El  
concentrado se ajustó a pH de 4,0 con ácido clorhídrico  
6N y se hizo pasar a través de una columna empacada con  
Diaion HP20 (3 litros). Después, la columna se lavó con  
agua (1 litro), el compuesto objeto se eluyó con etanol  
20 al 40% (8 litros). Las fracciones (4 litros) que conte-  
nían el compuesto objeto se recogieron y concentraron ba-  
jo presión reducida a una columna de 100 ml. El concentra-  
do se mezcló con celulosa pulverizada (300 g), tras de  
lo cual la mezcla se secó bajo presión reducida. El pol-  
vo seco se empacó en una columna y se llevó a cabo la e-  
25 lución con acetona (6 litros) a partir de la columna. El  
eluato se concentró bajo presión reducida a un volumen de  
50 ml. El concentrado se mezcló con tierra diatomácea  
(50 mg) y la mezcla se secó. La mezcla seca se sometió a  
una columna empacada con ácido silícico [disolvente de re-  
30 velado: una mezcla de cloroformo y metanol (10:1)]. Las

1 fracciones que contenían el compuesto objeto se recogie-  
ron y evaporaron a la sequedad bajo presión reducida. El  
residuo obtenido de esta manera se disolvió en metanol  
(20 ml). Se añadió agua (40 ml) a la solución, tras de  
5 lo cual la mezcla se dejó reposar durante la noche a 4°C  
para dar precipitados (560 mg), que se separaron median-  
te filtración y se disolvieron en metanol (10 ml). Se a-  
ñadió agua (20 ml) a la solución, tras de lo cual la mez-  
cla se dejó reposar durante la noche a 4°C para dar cris-  
10 tales, que se separaron y secaron para dar Nocardicina  
F (300 mg) en la forma de cristales blancos.

Ejemplo 5 (Producción de Nocardicina G)

Un medio acuoso (100 ml) que contenía 2% de su-  
15 crosa, 2% de harina de semilla de algodón, 1% de levadu-  
ra seca, 2,18% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1,43% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , se  
vertió en cada uno de ocho matraces de agitación de 500  
ml, y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos. Cultivo  
al rasgo de Nocardia uniformis subsp. tsuyamanensis ATCC  
20 21806, se inoculó en cada uno de los medios, y el orga-  
nismo se cultivó a 30°C durante 48 horas.

Por otra parte, otro medio acuoso (40 litros),  
que contenía 2% de almidón soluble, 2% de harina de semi-  
lla de algodón, 2% de levadura seca, 2,18% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
25 1,43% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,5% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% de L-  
tirosina y 0,1% de glicina, se ajustó a pH de 6,0 con so-  
lución de hidróxido de sodio acuoso 6N, tras de lo cual  
se vertieron 20 litros del medio en dos fermentadores de  
30 litros y se esterilizaron a 120°C durante 20 minutos.  
A cada uno de los medios se añadió el cultivo inoculado,

1 arriba preparado, en una cantidad de 2% por volumen del  
medio. El organismo se desarrolló en el medio a 30°C du-  
rante 96 horas. Durante el período de desarrollo, el cal-  
do se agitó a 300 r.p.m. y se hizo pasar aire estéril a  
5 través del caldo a una velocidad de 20 litros por minu-  
to. Subsecuentemente, el caldo cultivado (35 litros) se  
filtró con la ayuda de tierra diatomácea (3,5 Kg). El  
filtrado (30 litros) se concentró bajo presión reducida  
a un volumen de 3 litros. Se añadió al concentrado, con  
10 agitación, 15 litros de metanol, tras de lo cual la mez-  
cla se dejó reposar durante una hora para dar los preci-  
pitados que se eliminaron mediante filtración. El filtra-  
do (17 litros), se concentró bajo presión reducida a un  
volumen de un litro.

15 Las Todas las operaciones mencionadas antes en la  
presente, se llevaron a cabo a temperaturas menores que  
la ambiente (4°C)/.

El concentrado se ajustó a pH de 2,0 con ácido  
clorhídrico 6N. Se añadió al concentrado, acetato de eti-  
20 lo (2 litros), tras de lo cual la mezcla se agitó duran-  
te diez minutos y se separó la capa acuosa. Se añadió a  
la capa acuosa, 1,5 litros de n-butanol y 250 g de clo-  
ruro de sodio, tras de lo cual la mezcla se agitó duran-  
te 10 minutos y se separó la capa de n-butanol. Esta ex-  
25 tracción se repitió una vez más. A la capa de n-butanol  
combinada (3 litros), se añadió n-hexano (3 litros), tras  
de lo cual la mezcla se agitó durante 10 minutos y la ca-  
pa acuosa (400 ml) se separó. La capa acuosa se ajustó a  
pH de 7,0 con solución de hidróxido de sodio acuoso 1N y  
30 se concentró bajo presión reducida a un volumen de 300 ml.

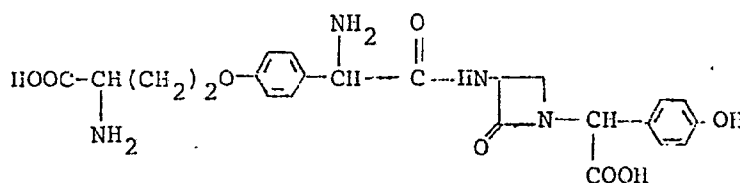
1 Se añadió al concentrado, 5 litros de agua y 50 g de clo-  
ruro de sodio, tras de lo cual la mezcla se ajustó a pH  
de 4,0 con ácido clorhídrico 1N. La mezcla se hizo pasar  
a través de una columna empacada con Diaion HP20 (2 li-  
5 tros). A continuación, el compuesto objeto se eluyó con  
agua (20 litros) de la columna. El eluato que contenía  
el compuesto objeto se recogió. Se añadió al eluato, 60 g  
de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , tras de lo cual, la mezcla se ajustó  
a pH de 9,0 con solución de hidróxido de sodio acuoso 1N  
10 y se hizo pasar a través de una columna empacada con  
Diaion HP20 (700 ml). La columna se lavó con solución de  
fosfato de sodio secundario acuoso al 1% (1 litro). Sub-  
secuentemente, el compuesto objeto se eluyó con agua (3  
litros). El eluato (2 litros) que contenía el compuesto  
15 objeto se recogió, se ajustó a pH de 8,0 con ácido clorhí-  
drico 1N y luego se hizo pasar a través de una columna  
empacada con carbón activado (300 g). La columna se la-  
vó con agua (1 litro). A continuación, el compuesto ob-  
jeto se eluyó con metanol acuoso al 80% (2 litros). El  
20 eluato se concentró bajo presión reducida a un volumen  
de 50 ml). El concentrado se liofilizó, se mezcló con una  
pequeña cantidad de celulosa y luego se sometió a cromatografía de columna sobre celulosa. La columna se reve-  
ló con n-butanol saturado con agua. El eluato (400 ml)  
25 que contenía el compuesto objeto, se recogió. Se añadió  
n-hexano (400 ml) al eluato, tras de lo cual, la mezcla  
se agitó durante 10 minutos y la capa acuosa se ajustó  
a pH 5,0 con solución de hidróxido de sodio acuoso 1N y  
se concentró bajo presión reducida a un volumen de 30 ml.  
30 El concentrado se dejó reposar durante la noche para dar

1 cristales, que se separaron, se lavaron con un pequeño volumen de agua, se secaron y luego se recrystalizaron para dar Nocardicina G (150 mg) en la forma de cristales.

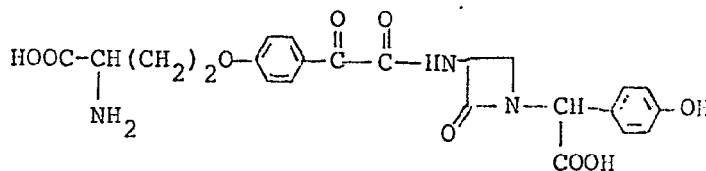
5 - REIVINDICACIONES -

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

10 1ª.- Un procedimiento para la obtención de Nocardicina elegida del grupo de Nocardicina C, Nocardicina D, Nocardicina E, Nocardicina F y Nocardicina G en el que la Nocardicina C tiene la estructura química siguiente:

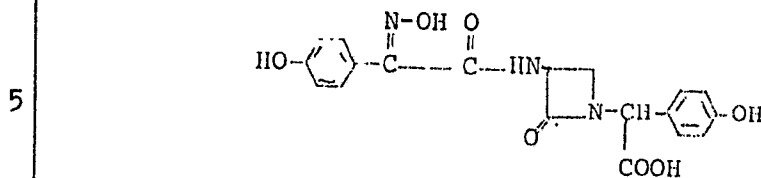


20 la Nocardicina D tiene la estructura química siguiente:

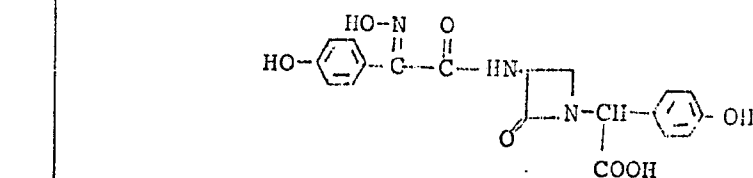


30

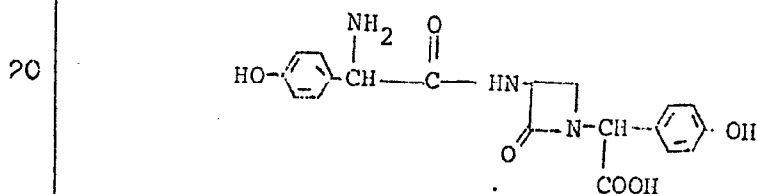
1 la Nocardicina E tiene la estructura química siguiente:



10 la Nocardicina F tiene la estructura química siguiente:



20 la Nocardicina G tiene la estructura química siguiente:



25 que comprende cultivar una Nocardicina C, D, E, F y/o G que produce la cepa que pertenece al género Nocardia en un medio nutritivo acuoso, bajo condiciones aeróbicas y recuperar la Nocardicina C, D, E, F ó G.

30 2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la cláusula 1, en el cual la Nocardicina C, D, E, F y/o G, que

1 produce la cepa, es una cepa de Nocardia uniformis subsp. tsuyamanensis.

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la cláusula 2, en el cual la cepa es Nocardia uniformis subsp. tsuyamanensis ATCC 21806 ó su mutante.

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la cláusula 1, en el cual la Nocardicina C se recupera de un caldo cultivado.

5ª.- Un procedimiento de acuerdo con la cláusula 1, en el cual la Nocardicina D se recupera de un caldo cultivado.

6ª.- Un procedimiento de acuerdo con la cláusula 1, en el cual la Nocardicina E se recupera del caldo cultivado.

7ª.- Un procedimiento de acuerdo con la cláusula 1, en el cual la Nocardicina F se recupera del caldo cultivado.

8ª.- Un procedimiento de acuerdo con la cláusula 1, en el cual la Nocardicina G se recupera del caldo cultivado.

9ª.- Un procedimiento para la obtención de Nocardicina.

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

25

30

1 Esta Memoria consta de cuarenta y una hojas es-  
critas a máquina por una sola cara.

Madrid, 22.DIC.1976

P.A.

5  
Alberto de Elizaburu  
Per Pedro 

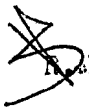
10

15

20

25

30

 M.B.