



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	12	459051	10	A7
		21					
		22	FECHA DE PRESENTACION		23-5-77		

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
689,273	24-5-76	Estados Unidos
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D 1A61K	
54 TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL DERIVADO AGLICONA DEL A-35512 FACTOR B		
71 SOLICITANTE (S)		
ELI LILLY AND COMPANY		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
307 East McCarty Street - Indianapolis Indiana - Estados Unidos		
72 INVENTOR (ES)		
Manuel Debono, de nacionalidad estadounidense		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

POOR  
QUALITY

1

La aglicona del antibiótico A-35512 factor B es un nuevo y útil agente antibacteriano. Una hidrólisis ácida suave del A-35512 factor B elimina varios azúcares para formar la aglicona de A-35512 factor B.

5

Los antibióticos A-35512 son antibióticos glicopéptidos estrechamente relacionados. El antibiótico A-35512 factor B, el elemento más completamente caracterizado del complejo antibiótico A-35512, parece ser un nuevo miembro del grupo de antibióticos que contienen grupos péptidos entre los que se encuentran la vancomicina (patente estadounidense n° 3.067.099), A-4696 A, B y C (patente estadounidense núm. 3.952.095) avoparcina (patente estadounidense n° 3.855.410), ristomicina A (Lomakina, N., Séptimo Simposio Internacional de Química de Productos Nacionales, Riga, Latvia, pág. 625, 1970) y ristocetina A (patente estadounidense n° 2.990.329).

10

15

Los antibióticos A-35512 difieren de estos antibióticos conocidos, por ejemplo, en el movimiento en diversos sistemas cromatográficos y en el contenido en aminoácidos y azúcares.

20

Los antibióticos A-35512 que incluyen los factores A, B, C, E, F, G y H están descritos en la solicitud de patente copendiente titulada "Un Procedimiento para la Producción de la mezcla Antibiótica A-35512", presentada con esta misma fecha.

25

Aunque actualmente se conocen muchos agentes antibacterianos, continúa la necesidad de nuevos antibióticos mejorados. Un problema en la terapia actual con antibióticos es la diferencia de eficacias contra los organismos patógenos. Otro problema es el hecho de que continuamente se desarrollan cepas de organismos que son resistentes a los antibióticos actualmente utilizados. Todavía otro problema es el hecho de que los pacientes individuales con frecuencia presentan graves

30

1 reacciones a ciertos antibióticos específicos, debidas a hi-  
persensibilidad y/o a efectos tóxicos. Debido a estos pro-  
blemas en la terapia actual, un objeto de esta invención es  
5 proporcionar nuevos antibióticos para uso contra las enfer-  
medades causadas por los microorganismos.

Esta invención también proporciona un procedimiento  
de producción del derivado aglicona del A-35512 factor B,  
caracterizado por:

- 10 a) cultivar Streptomyces candidus NRRL 8156 o un mutante del  
mismo productor de A-35512, en un medio de cultivo que  
contenga fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitró-  
geno y sales inorgánicas, en condiciones de fermentación  
aerobia sumergida, hasta que se ha producido una cantidad  
sustancial de actividad antibiótica;
- 15 b) separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cultivo;
- c) aislar el antibiótico A-35512 factor B de la mezcla anti-  
biótica A-35512 y
- d) preparar la aglicona del antibiótico A-35512 factor B a  
partir del antibiótico A-35512 factor B.

20 El espectro de absorción infrarrojo de la aglicona  
del A-35512 factor B (en suspensión de Nujol) se encuentra  
en la figura que acompaña esta memoria.

Aglicona del antibiótico A-35512 factor B

25 El hidrocloreuro de la aglicona del A-35512 factor B  
es un compuesto amorfo blanco, con la siguiente composición  
porcentual elemental aproximada:

Carbono, 54,29 %;

Hidrógeno, 4,34 %;

Nitrógeno, 7,40 %;

30 Cloro, 5,02 %;

1

Oxígeno, 28,95 % (por diferencia).

5

El espectro de absorción infrarrojo del hidrocloreuro de la aglicona del A-35512 factor B en suspensión de Nujol es el mostrado en la Figura 6 de los dibujos que acompañan a esta memoria. Los picos de absorción más significativos aparecen a las siguientes frecuencias ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3440 (hombro), 3340 (hombro), 3215 (intenso), 2950 (hombro), 2910 (intenso), 2840 (intenso), 2640 (hombro), 1735 (débil), 1655 (intenso), 1590 (medio), 1500 (intenso), 1460 (intenso), 1378 (medio), 1365 (hombro), 1298 (medio), 1215 (medio), 1155 (medio), 1120 (hombro), 1105 (débil), 1060 (débil), 1040 (débil), 1008 (medio), 925 (débil), 875 (débil), 765 (hombro) y 718 (débil).

10

15

La valoración electrométrica del hidrocloreuro de aglicona del A-35512 factor B en dimetilformamida acuosa al 66 % indica la presencia de tres grupos valorables con unos valores  $\text{pK}_a$  de 7,5, 9,25 y 11,0 aproximadamente y la posible presencia de dos grupos adicionales con unos valores  $\text{pK}_a$  superiores a 11,0.

20

El hidrocloreuro de aglicona del A-35512 factor B tiene un peso molecular de 1282 aproximadamente, determinado por valoración.

25

El hidrocloreuro de aglicona del A-35512 factor B presenta las siguientes rotaciones específicas:

$$[\alpha]_D^{25} -178^\circ (c = 5, \text{ metanol})$$

$$[\alpha]_{365}^{25} -716,8^\circ (c = 5, \text{ metanol}).$$

30

El espectro de absorción ultravioleta del hidrocloreuro de aglicona del A-35512 factor B presenta, en metanol ácido y neutro, un máximo de absorción a 282 nm ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} 102,62$ )

1 y en metanol básico, un máximo de absorción a 302 nm  
( $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  182,09).

5 El espectro de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  de  
la aglicona del A-35512 factor B en DMSO- $d_6$  a 90°C tiene las  
siguientes características:

<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	187,8	37,2
2	172,0	40,9
3	170,7	45,2
10 4	170,1	46,9
5	169,6	47,7
6	168,4	57,6
7	166,7	52,5
8	157,4	49,9
15 9	156,6	45,5
10 10	155,7	55,8
11	155,6	71,5
12	155,4	56,7
13	154,5	50,5
20 14	149,3	43,0
15 15	138,8	38,8
16	136,9	54,3
17	136,3	40,2
18	135,2	31,7
25 19	134,7	28,4
20 20	133,8	40,9
21	128,2	102,9
22	126,2	77,2
23	123,0	57,5
30 24	121,3	38,1

	<u>Nº</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	25	117,7	44,4
	26	117,0	31,5
	27	108,6	31,0
5	28	106,7	47,9
	29	105,7	81,2
	30	103,2	26,5
	31	93,6	33,4
	32	74,9	39,8
10	33	71,8	33,9
	34	68,9	40,2
	35	63,2	43,1
	36	60,4	33,6
15	37	57,1	57,8
	38	55,2	33,1
	39	53,2	30,1
20	40	51,8	36,0
	41	40,7	43,4*
	42	39,9	60,9*
	43	39,1	43,9*
	44	23,8	55,7
	45	17,1	47,8
	46	0,0	43,7

\* DMSO-d<sub>6</sub>

25

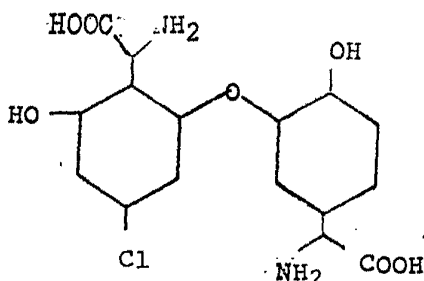
El espectro de RMN<sup>13</sup>C indica que la aglicona del A-35512 factor B continúa reteniendo el radical 3-amino-2,3,6-tridesoxi-3-C-metil-L-xilo-hexopiranososa (uno de los azúcares presentes en el A-35512 factor B).

30

El análisis de aminoácidos del hidrocloreuro de aglicona del A-35512 factor B más hidrolizado con ácido indica

1 que la aglicona del A-35512 factor B contiene glicina y por lo menos tres restos aminoácidos complejos. La estructura de uno de estos restos aminoácidos parece ser la siguiente:

5



10

El hidrocioruro de aglicona del A-35512 factor B contiene como mínimo un grupo hidroxilo capaz de esterificación.

15

El hidrocioruro de aglicona del A-35512 factor B es soluble en agua y metanol pero es insoluble en los disolventes orgánicos menos polares como benceno, cloroformo, acetona, éter dietílico, acetato de etilo, tolueno, hexano, acetonitrilo y dioxano.

20

El hidrocioruro de aglicona del A-35512 factor B presenta un valor de  $R_f$  aproximado de 0,80 en cromatografía en capa fina de celulosa (soporte de aluminio), utilizando un sistema disolvente de 1-butanol/piridina/ácido acético/agua (15:10:3:12). El método de detección preferido es la bioautografía utilizando Sarcina lutea.

25

El hidrocioruro de aglicona A-35512 factor B tiene un valor de  $R_f$  aproximado de 0,26 en cromatografía en capa fina de gel de sílice, utilizando un sistema disolvente de metanol/cloroformo/ $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado (3:2:1).

30

La aglicona del A-35512 factor B (base libre) es un compuesto amorfo blanco con la siguiente composición elemental porcentual aproximada (promedio):

1                   Carbano, 52,65 %  
                  Hidrógeno, 4,57 %;  
                  Nitrógeno, 6,91 %;  
                  Cloro, 2,94 %;  
5                   Oxígeno, 27,04 %;  
                  Cenizas, 4,70 %.

10                   El espectro de absorción infrarrojo de la aglicona del A-35512 factor B (base libre) en pastilla de bromuro potásico presenta picos de absorción significativos a las siguientes frecuencias ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3360 (intenso), 3260 (hombro), 2940 (hombro), 1735 (hombro), 1660 (intenso), 1598 (medio), 1510 (intenso), 1440 (medio), 1295 (débil), 1215 (medio), 1165 (medio), 1122 (débil), 1070 (débil), 1018 (intenso), 940 (débil) y 920 (débil).

15                   La valoración electrométrica de la aglicona del A-35512 factor B (base libre) en dimetilformamida acuosa al 66 % indica la presencia de cinco grupos valorables con unos valores  $\text{pK}_a$  de aproximadamente 6,2, 8,2, 10,1, 11,4 y 12,4 y la posible presencia de uno o dos grupos adicionales con valores  $\text{pK}_a$  mayores de 12,5.

20                   La aglicona del A-35512 factor B (base libre) presenta la siguiente rotación específica:

$$[\alpha]_D^{25} - 64,5^\circ \quad (c = 3, \text{DMSO}).$$

25                   El espectro de absorción ultravioleta de la aglicona del A-35512 factor B (base libre) presenta, en metanol neutro y ácido, un máximo de absorción a 282 nm ( $E_{1 \text{ cm}}^{1\%}$  43,65) y, en metanol básico, un máximo de absorción a 301 nm ( $E_{1 \text{ cm}}^{1\%}$  67,46).

30                   La aglicona del A-35512 factor B (base libre) presenta unos valores de  $R_f$  aproximados iguales a los descritos

1 anteriormente para el hidrocioruro de aglicona de A-35512 factor B.

5 Además de la base libre y del hidrocioruro de la aglicona del A-35512 factor B, también forman parte de esta invención otras sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables de la aglicona del A-35512 factor B. Las sales "farmacéuticamente aceptables" son sales donde la toxicidad del compuesto en su conjunto frente a los animales de sangre caliente no es superior a la de la forma no salina. Son sales representativas y adecuadas de la aglicona del A-35512 factor B las sales formadas por reacciones comunes con ácidos orgánicos e inorgánicos como, por ejemplo, sulfúrico, fosfórico, acético, succínico, cítrico, láctico, maleico, fumárico, palmítico, cólico, pamoico, mícico, D-glutámico, 15 d-canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, metanosulfónico, bencenosulfónico, sórbico, pícrico, benzoico, cinámico y ácidos similares.

A-35512 factor B

20 El A-35512 factor B es un compuesto básico, amorfo y blanco. La fórmula empírica aproximada del A-35512 factor B es  $C_{97-99}H_{101-105}N_{8-9}O_{46-48}Cl$ . El A-35512 factor B presenta la siguiente composición elemental porcentual promedia:

25 Carbono, 53,97 %;  
Hidrógeno, 4,75 %;  
Nitrógeno, 5,25 %;  
Oxígeno, 34,29 %;  
Cloro, 1,59 %.

30 Esta composición elemental concuerda especialmente con una fórmula empírica preferida  $C_{98}H_{104}N_9O_{47}Cl$  (calculado: C, 53,60; H, 4,75; N, 5,74; O, 34,30; Cl, 1,61). Otra fórmula

1 empírica preferida es  $C_{98}H_{103}N_8O_{47}Cl$  (calculado: C, 54,00; H, 4,55; N, 5,15; O, 34,50; Cl, 1,60).

5 El espectro de absorción ultravioleta (UV) del A-35512 factor B presenta, en metanol ácido y neutro, un máximo de absorción a 282 nm ( $\epsilon$  15000) y, en metanol básico, un máximo de absorción a 292 nm ( $\epsilon$  16000), calculado utilizando un peso molecular de 2000. El espectro UV del A-35512 factor B también presenta absorción terminal a 225 nm.

10 El A-35512 factor B presenta las siguientes rotaciones específicas:

$$[\alpha]_D^{25} -123^\circ \text{ (c = 1, agua)}$$

$$[\alpha]_{365}^{25} - 446^\circ \text{ (c = 1, agua).}$$

15 La valoración electrométrica del A-35512 factor B en dimetilformamida acuosa al 66 % indica la presencia de cuatro grupos valorables con valores  $pK_a$  de 7,15, 8,81, 10,20 y 12,00 aproximadamente y la posible presencia de otro grupo con un valor  $pK_a$  mayor de 13,50.

20 El peso molecular aparente del A-35512 factor B, determinado por valoración, es alrededor de 2143.

25 El dihidrocloruro del A-35512 factor B es un compuesto cristalino blanco (cristalizado de metanol acuoso al 50 %). Aunque el dihidrocloruro del A-35512 factor B es higroscópico y no presenta un punto de fusión definido, un termograma muestra una pérdida de peso que comienza a 25°C, dando lugar a una pérdida de 7,4 % a 121°C; a 135°C se produce otra pérdida, dando lugar a una descomposición.

30 El dihidrocloruro de A-35512 factor B tiene la siguiente composición elemental porcentual aproximada (promedio):

Carbono, 52,57 %;

Hidrógeno, 4,80 %;

POOR  
QUALITY

1 Nitrógeno, 5,66 %;  
Oxígeno, 32,86 %;  
Cloro, 4,51 %.

5 Esta composición elemental concuerda especialmente con otra fórmula empírica  $C_{98}H_{103}N_9O_{47}Cl \cdot 2HCl$  (calculado: C, 51,93; H, 4,65; N, 5,57; O, 33,20; Cl, 4,65).

10 El espectro UV del dihidrocloruro del A-35512 factor B presenta, en metanol ácido y neutro un máximo de absorción a 282 nm ( $\epsilon$ 12000) y, en metanol básico, un máximo de absorción a 292 nm ( $\epsilon$ 14000), calculado utilizando un peso molecular de 2000). El espectro UV del dihidrocloruro del A-35512 factor B también presenta absorción terminal a 225 nm.

15 El dihidrocloruro del A-35512 factor B presenta las siguientes rotaciones específicas:

$[\alpha]_D^{25} -128^\circ$  (c = 1, agua).  
 $[\alpha]_{365}^{25} -475^\circ$  (c = 1, agua).

20 La valoración electrométrica del dihidrocloruro del A-35512 factor B en dimetilformamida acuosa al 66 % indica la presencia de cuatro grupos valorables con unos valores  $pK_a$  de 7,15, 8,87, 10,30 y 12,10 aproximadamente y la posible presencia de otro grupo con un  $pK_a$  mayor de 13,1.

25 El peso molecular aparente del dihidrocloruro del A-35512 factor B, determinado por valoración, es alrededor de 2027.

30 El espectro de resonancia magnética nuclear  $^{13}C$  del dihidrocloruro del A-35512 factor B en  $D_2O$  tiene las siguientes características:

N°	ppm	Atura (%)
2	173,0	4,1
3	171,9	3,7

1	<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
	4	171,6	3,3
	5	171,0	5,8
	6	170,8	5,0
5	7	169,6	3,6
	8	159,0	4,1
	9	157,9	4,4
	10	157,5	3,7
	11	156,6	4,8
10	12	155,6	6,1
	13	155,3	4,2
	14	154,9	3,3
	15	154,3	4,2
	16	151,7	3,3
15	17	144,3	3,1
	18	136,7	3,5
	19	136,2	4,9
	20	135,4	4,0
	21	135,2	4,4
20	22	133,6	4,2
	23	133,3	4,1
	24	129,8	1,7
	25	129,3	3,0
	26	128,8	2,6
25	27	127,6	1,5
	28	126,1	3,9
	29	124,2	5,6
	30	122,4	1,4
	31	122,0	4,4
30	32	120,7	3,3

	<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	33	116,5	2,7
	34	109,5	0,8
	35	108,2	1,1
5	36	107,7	2,7
	37	104,5	1,7
	38	101,8	2,9
	39	100,9	1,6
	40	98,2	1,0
10	41	76,9	1,2
	42	76,1	1,8
	43	74,1	2,0
	44	73,5	2,7
	45	72,7	2,4
15	46	72,3	4,0
	47	71,0	7,1
	48	70,3	2,5
	49	69,7	2,5
	50	67,4	74,7*
20	51	64,6	1,2
	52	62,0	1,5
	53	58,0	1,3
	54	56,8	1,7
	55	55,4	3,9
25	56	54,3	2,5
	57	24,5	2,0
	58	17,9	3,0
	59	17,2	2,0
30	60	16,3	2,5

\* patrón de dioxano.

1

El dihidrocloruro del A-35512 factor B, cristalizado en metanol-agua, presenta el siguiente diagrama característico de difracción de rayos X en polvo (radiación  $\text{Cu}^{++}$ ,  $1,5405 \text{ \AA}$ , filtro de níquel,  $d =$  distancia interplanar en Angstroms):

5

<u>d</u>	<u>Intensidad relativa</u>
17,15	100
12,90	80
10,85	70
9,25	70
8,87	60
8,22	50
7,86	50
6,93	40
6,20	40
5,62	40
5,04	05
4,02	02
3,54	02

10

15

20

El espectro de absorción infrarrojo del dihidrocloruro del A-35512 factor B en pastilla de bromuro potásico fue determinado.

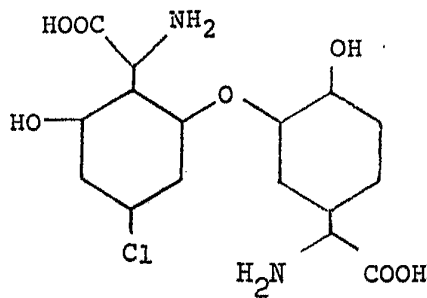
25

Los máximos de absorción más significativos aparecen a las siguientes frecuencias ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3420 (intenso), 3300 (hombro), 2950 (débil), 1752 (débil), 1675 (intenso), 1630 (hombro), 1605 (intenso), 1520 (intenso), 1470 (débil), 1440 (débil), 1410 (débil), 1345 (hombro), 1312 (medio), 1225 (medio), 1180 (débil), 1135 (débil), 1080 (intenso) y 1020 (débil).

30

El análisis de aminoácidos del dihidrocloruro del

1 A-35512 factor B hidrolizado con ácido indica que el A-35512  
 factor B contiene como mínimo cinco restos aminoácidos, uno  
 de los cuales es la glicina. Los cuatro restos aminoácidos  
 5 restantes en el A-35512 factor B son complejos y parecen ser  
 idénticos a los encontrados en el A-35512 factor A. La estruc-  
 tura de uno de estos restos aminoácidos parece ser la si-  
 guiente:



15 El análisis de sus productos de hidrólisis ácida indi-  
 ca que el dihidrocloruro del A-35512 factor B contiene los  
 siguientes azúcares: glucosa, fucosa, manosa, ramnosa y 3-  
 amino-2,3,6-tridesoxi-3-C-metil-L-xilo-hexopiranosas. La hi-  
 drólisis ácida suave del dihidrocloruro del A-35512 factor B  
 elimina los grupos glucosa, fucosa, manosa y ramnosa para  
 20 dar el derivado aglicona característico.

El dihidrocloruro del A-35512 factor B contiene como  
 mínimo un grupo hidroxilo susceptible de esterificación.

25 El dihidrocloruro del A-35512 factor B es soluble en  
 agua, parcialmente soluble en alcoholes como metanol y eta-  
 nol e insoluble en otros disolventes orgánicos menos polares  
 como benceno, cloroformo, acetona, éter dietílico, acetato  
 de etilo, tolueno, hexano, acetonitrilo y dioxano.

30 El dihidrocloruro del A-35512 factor B es estable du-  
 rante 72 horas en soluciones acuosas a un pH de 3 a 10 apro-  
 ximadamente.

1 El A-35512 factor B se produce cultivando una cepa de Streptomyces candidus NRRL 8156 productora de A-35512, en condiciones aerobias sumergidas, en un medio de cultivo adecuado, hasta que se ha producido una actividad antibiótica sustancial. El A-35512 factor B se recupera empleando diversas técnicas de aislamiento y purificación utilizadas en fermentaciones.

5 El medio de cultivo empleado para cultivar el Streptomyces candidus NRRL 8156 (Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Peoria, Illinois, 61604) puede ser uno cualquiera entre diversos medios. Por razones de economía de producción, rendimiento óptimo y facilidad de aislamiento del producto, sin embargo, se prefieren ciertos medios de cultivo. Así, por ejemplo, una fuente preferida de hidratos de carbono en la fermentación a gran escala es la sacarosa, aunque también pueden emplearse la glucosa, dextrina de tapioca, fructosa, manitol, maltosa, lactosa y similares. Una fuente de nitrógeno preferida es la peptona soluble de carne, aunque también son útiles la harina de soja, la harina de sangre de cerdo, los aminoácidos como el ácido glutámico y similares. Entre las sales inorgánicas nutrientes que pueden incorporarse a los medios de cultivo se encuentran las sales solubles acostumbradas capaces de dar iones cinc, sodio, magnesio, calcio, amonio, cloruro, carbonato, sulfato, nitrato y similares.

15  
20  
25  
30 Los elementos traza esenciales para el crecimiento y desarrollo del organismo también deben incluirse en el medio de cultivo. Estos elementos traza normalmente aparecen como impurezas en los otros constituyentes del medio en cantidades

1 suficientes para responder a las necesidades de crecimiento del organismo.

5 Puede ser necesario agregar pequeñas cantidades (es decir, 0,2 ml/l) de un agente antiespumante como el polipropilenglicol a los medios de fermentación a gran escala, si la formación de espuma plantea problemas.

10 Para la producción de cantidades importantes de los antibióticos A-35512, se prefiere la fermentación aerobia sumergida en tanques. Pueden obtenerse pequeñas cantidades de los antibióticos A-35512 mediante cultivo en matraces sacudidos. Debido al retraso en la producción de antibióticos comúnmente asociado a la inoculación de grandes tanques con la forma esporada del organismo, es preferible utilizar un inoculum vegetativo. El inoculum vegetativo se prepara 15 inoculando un pequeño volumen de medio de cultivo con las esporas o con fragmentos miceliales del organismo para obtener un cultivo fresco y de crecimiento activo del organismo. El inoculum vegetativo se transfiere después a un tanque mayor.

20 El organismo productor de A-35512 puede ser cultivado a temperaturas comprendidas entre 20 y 40°C aproximadamente. Al parecer la producción óptima del A-35512 tiene lugar a temperaturas de unos 30-34°C.

25 Como es costumbre en los procesos de cultivo sumergido aerobio, se hace pasar aire estéril a través del medio de cultivo. Para un crecimiento eficiente del organismo, el volumen de aire empleado en la producción en tanques es preferiblemente superior a 0,1 volúmenes de aire por volumen medio de cultivo por minuto (V/V/M). Para una producción eficiente 30 de los antibióticos A-35512, el volumen de aire empleado en

1 la producción en tanques es preferiblemente alrededor de 0,25 V/V/M.

5 La producción de los antibióticos A-35512 puede ser seguida durante la fermentación sometiendo a ensayo algunas muestras del caldo o de los extractos de los sólidos miceliales para determinar la actividad antibiótica frente a organismos que se sabe que son sensibles a los antibióticos. Un organismo de ensayo útil en la determinación de estos antibióticos es el Bacillus subtilis ATCC 6633. El bioanálisis se realiza preferiblemente mediante un disco de papel sobre placas de agar que contienen un medio nutritivamente limitado.

10 Después de su producción en condiciones de fermentación aerobia sumergida, los antibióticos A-35512 pueden ser recuperados del medio de fermentación por métodos empleados en este campo. La actividad antibiótica producida durante la fermentación de un organismo productor de A-35512 generalmente aparece en el caldo filtrado. Por lo tanto, la recuperación máxima de los antibióticos A-35512 se consigue mediante una filtración inicial para separar la masa micelial. El caldo filtrado puede ser purificado para dar la mezcla A-35512 utilizando diversas técnicas. Una técnica preferida es la adsorción del caldo filtrado sobre una columna de poliamida y elución de la columna con agua y mezclas de agua y alcohol. Las fracciones eluidas que presentan actividad antibiótica pueden ser combinadas para dar la mezcla A-35512. Utilizando esta técnica, también pueden combinarse las fracciones eluidas sobre la base de su comportamiento cromatográfico en capa fina para dar A-35512 factor B purificado.

20  
25  
30 Los antibióticos A-35512 factores A, B, C, E y H y can-

1 tidades menores de factores F y G son separados conveniente  
mente por cromatografía de papel, utilizando un sistema di-  
solvente de 1-butanol/piridina/ácido acético/agua  
5 (15:10:3:12). El método de detección preferido es la bio-  
autografía empleando Sarcina lutea. Los valores  $R_f$  aproxi-  
mados de los factores A-35512 en este sistema se encuentran  
en la Tabla I.

TABLA I

<u>Factor A-35512</u>	<u>Valor <math>R_f</math></u>
Factor A.2HCl	0,21
Factor B.2HCl	0,34
Factor C.2HCl	0,46
Factor E.HCl	0,64
Factor F	0,81
Factor G	0,93
Factor H.HCl	0,15.

10 La purificación más intensa de los factores A-35512  
individuales comprende procesos adicionales de adsorción y  
extracción. Pueden utilizarse ventajosamente materiales adsor-  
bentes como alúmina, gel de sílice, resinas cambiadoras de  
15 ion y similares.

Los factores A-35512 aparecen en el caldo de fermenta-  
ción en forma de hidroclo-  
20 ruros. El procedimiento preferido  
de separación con poliamida proporciona el A-35512 factor B  
como dihidrocloruro.

Se prepara la aglicona del A-35512 factor B por hidró-  
lisis ácida suave del A-35512 factor B. El A-35512 factor B  
es más fácilmente asequible en forma de su dihidrocloruro.  
25 Por lo tanto, el dihidrocloruro del A-35512 factor B es un  
material de partida preferido para la preparación de aglico-  
30

1 na del A-35512 factor B. También pueden utilizarse el A-35512  
factor B u otras sales de adición de ácidos del A-35512 fac-  
tor B. La hidrólisis ácida se realiza siguiendo los procedi-  
5 mientos habituales. Aunque puede utilizarse uno cualquiera  
de diversos ácidos, el ácido clorhídrico es el ácido prefe-  
rido para la preparación de la aglicona del A-35512 factor B.  
Cuando se emplea ácido clorhídrico, la aglicona del A-35512  
factor B se recupera en forma de hidrocioruro. La hidrólisis  
se lleva a cabo preferiblemente en agua a reflujo, durante  
10 un periodo de 1 a 2 horas aproximadamente. Si se utilizan  
tiempos de reacción más largos se produce la degradación de  
la aglicona para formar productos menos activos y más tarde  
inactivos. Los tiempos de reacción óptimos para unas condicio-  
nes de reacción específicas pueden ser determinados mediante  
15 la bioactividad de partes alícuotas de la mezcla de reacción.

La aglicona del A-35512 factor B y sus sales farmacéuti-  
camente aceptables inhiben el crecimiento de ciertos organis-  
mos patógenos, especialmente las bacterias Gram-positivas.

20 La actividad de la aglicona del A-35512 factor B, medi-  
da mediante el ensayo convencional de difusión en disco (gua-  
tas de 6 mm sumergidas en soluciones que contienen 1 mg del  
compuesto de ensayo por mililitro de solución y colocadas so-  
bre placas de agar sembradas con el organismo de ensayo) está  
resumida en la Tabla II.

25 TABLA II

<u>Organismo de ensayo</u>	<u>Zona de inhibición (mm) de la aglicona del A-35512 factor B (base libre)</u>
<u>Staphylococcus aureus</u>	19
<u>Bacillus subtilis</u>	13
<u>Sarcina lutea</u>	14
<u>Bacillus subtilis*</u>	22

30

1 \* Con agar nutritivamente limitado.

5 La Tabla III contiene los valores de las concentraciones mínimas de inhibición (CMI) a los cuales el hidrocloreuro de la aglicona del A-35512 B es activo contra cepas seleccionadas de Staphylococcus aureus, determinado por ensayos de dilución en agar habituales.

TABLA III

<u>Organismo de ensayo</u>	<u>CMI (mcg/ml)</u>
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055*	0,5
<u>Staphylococcus aureus</u> H290*	0,5
<u>Staphylococcus aureus</u> V92*	0,5
<u>Staphylococcus aureus</u> V104*	0,25
<u>Staphylococcus aureus</u> 3064**	0,25
<u>Staphylococcus aureus</u> H43**	0,5
<u>Staphylococcus aureus</u> V57**	0,5
<u>Staphylococcus aureus</u> H356**	1,0
<u>Staphylococcus aureus</u> 3130***	0,5
<u>Staphylococcus aureus</u> 3131****	0,5

10

15

20

\* Susceptible a la penicilina G

\*\* Resistente a la penicilina G

\*\*\* Resistente a la penicilina G, resistente a la meticilina

\*\*\*\* Resistente a la penicilina G, resistente a la meticilina, resistente a la clindamicina.

25

La Tabla IV contiene los resultados adicionales del ensayo de dilución en agar para el hidrocloreuro de aglicona del A-35512 factor B frente a diversos estreptococos del grupo D.

30

TABLA IV

<u>Organismo de ensayo</u>	<u>CMI (mcg/ml)</u>
<u>Streptococcus</u> sp. Shrigley	1,0
<u>Streptococcus</u> sp. Mitis	1,0
<u>Streptococcus</u> sp. 12253F	1,0
<u>Streptococcus</u> sp. SS992	1,0
<u>Streptococcus</u> sp. 9933	1,0
<u>Streptococcus</u> sp. 9913	1,0
<u>Streptococcus</u> sp. 282	1,0
<u>Streptococcus</u> sp. 238	1,0

La aglicona del A-35512 factor B ha presentado actividad antibacteriana in vivo contra infecciones bacterianas experimentales. Cuando se administraron dos dosis subcutáneas del hidrocloreuro de la aglicona del A-35512 factor B a ratones en infecciones ilustrativas, se midieron las actividades observadas como valor DE<sub>50</sub>. En la Tabla V se dan los valores DE<sub>50</sub> observados para el hidrocloreuro de la aglicona del A-35512 factor B.

TABLA V

<u>Organismo de ensayo</u>	<u>DE<sub>50</sub></u>	<u>Ataque infeccioso</u>
<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	5,8	2570 x DL <sub>50</sub> (ip)
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	7,0	374 x DL <sub>50</sub> (ip)
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	1,04	370 x DL <sub>50</sub> (ip)

Para ilustrar con más detalle la puesta en práctica de esta invención, se incluyen los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

Preparación del A-35512 factor B

A. Fermentación en matraces sacudidos del A-35512

Se disuelve una pastilla liofilizada de Streptomyces candidus NRRL 8156 en 1-2 ml de agua esterilizada. Esta solu-

1 ción se utiliza para inocular un tubo inclinado de agar extracto de levadura-malta Bacto (ISP n°2, Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

El tubo inoculado se incuba a 30°C durante unos 7 días.

5 El cultivo maduro del tubo se cubre con 2 ml de agua y se rasca con una pipeta estéril para soltar las esporas. Se utilizan 0,1 ml de esta suspensión acuosa de esporas para inocular otro tubo inclinado de agar ISP n° 2. Este tubo inoculado se incuba a 30°C durante unos 7 días. El cultivo maduro del tubo se cubre con 5 ml de agua y se rasca con una pipeta estéril para liberar las esporas. Se utilizan 2,5 ml de la suspensión de esporas resultante para inocular 50 ml de un medio vegetativo de la siguiente composición:

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad</u>
Caldo de soja tripticasa (Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, Md.)	30 g
Agua desionizada, c.s. para	1 litro

15 El medio vegetativo inoculado se incuba en un Erlenmeyer de 250 ml a 30°C durante 48 horas, en un sacudidor que gira describiendo un arco de 2" (5 cm) de diámetro, a 250 rpm.

20 Se utilizan 0,5 ml de este medio vegetativo incubado para inocular 50 ml de un medio de producción de la siguiente composición:

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad (g/l)</u>
Dextrina de tapioca	25,0
Glucosa	10,0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,5
KCl	1,5
MgSO <sub>4</sub>	1,1
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,03

1	<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad (g/l)</u>
	$ZnCl_2$	0,03
	$KH_2PO_4$	0,1
	Acido L-glutámico	1,0
5	DL-citrulina	0,1
	$CaCO_3$	5,0
	Agua desionizada c.s. para	1 litro

El medio de producción inoculado se incuba en un Erlenmeyer de 250 ml a 32°C; durante 8-10 días, en un sacudidor que gira describiendo un arco de 2" (5 cm) de diámetro a 250 rpm.

**B. Fermentación en tanques del A-35512**

Para conseguir un volumen mayor de inoculum, se utilizan 20 ml del medio vegetativo incubado preparado como se ha descrito antes para inocular 400 ml de un medio de cultivo vegetativo de segunda fase, que tiene la misma composición que el medio vegetativo. Este medio de segunda fase se incubaba en un matraz de 2 litros durante 24 horas a 32°C, en un sacudidor que gira describiendo un arco de 2" (5 cm) de diámetro a 250 rpm.

Se utilizan 800 ml del medio vegetativo incubado de la segunda fase, así preparado, para inocular 100 litros de un medio de producción estéril. El medio de producción inoculado se deja fermentar en un tanque de fermentación de 165 litros durante unos 8 o 10 días, a una temperatura de 32°C. El medio de fermentación se airea con aire estéril a un caudal de 0,25 V/V/M y se agita con agitadores convencionales a 200 rpm.

**C. Separación de la mezcla antibiótica A-35512**

Se filtran 250 galones (946 litros) del caldo de fermentación completo, obtenido como se ha descrito en el Ejemplo 1,

30

1 utilizando un auxiliar de filtración (Hyflo Super-cel, tierra de diatomeas, Johns-Manville Products Corp.) a un pH del  
caldo de 6,8-7,2. El filtrado transparente así obtenido se  
5 pasa por una columna que contiene 10 ml de adsorbente polimérico (Amberlite XAD-4, Rohm and Haas Co.) por 100 ml de  
caldo filtrado, a un caudal de 150 ml por minuto. Las fracciones así obtenidas se examinan para determinar su actividad biológica utilizando un ensayo normalizado en disco frente a Sarcina lutea. El efluente biológicamente inactivo se desprecia. La columna se lava con agua (1/8 del volumen del  
10 caldo) a un caudal de 150 ml por minuto. Las aguas de lavado inactivas se desprecian.

Después la columna se eluye con una solución acuosa de metanol al 50 % (600 litros) a un caudal de 200 ml por minuto. El eluato, que contiene la mezcla antibiótica A-35512, se concentra a vacío hasta un volumen de 15 litros que contienen alrededor de 200 g de la mezcla antibiótica A-35512 por litro.

#### D. Separación del A-35512 factor B

20 La mezcla antibiótica A-35512 (unos 3000 g disueltos en 15 litros de metanol), obtenida como se ha descrito en la Sección C, se cromatografía en una columna de poliamida (Woelm, 100 litros). La columna se eluye con agua desionizada a un caudal de unos 80-120 mm por minuto.

25 Las fracciones se exploran utilizando cromatografía en capa fina de celulosa o cromatografía de papel, con un sistema disolvente de n-butanol/piridina/ácido acético/agua (15:10:3:12) y bioautografía en Sarcina lutea.

30 Se desprecian los 100 primeros litros de eluato. Después se ajusta el caudal a unos 160-200 ml por minuto y se recogen

1 fracciones de 12 litros. De esta manera se recogen 20 fracciones.

5 En este momento se cambia el disolvente eluyente a un gradiente de agua-metanol, utilizando el siguiente procedimiento:

Una vasija que contiene 360 litros de metanol se vacía mediante sifón en una vasija que contiene 120 litros de agua. En la vasija de agua se agita la solución mezclada y se introduce en la columna. Se recogen 24 fracciones (de 24 litros cada una) a un caudal de 200-300 ml/minuto.

10 Basándose en los resultados de la bioautografía, se combinan grupos de fracciones y se evaporan a sequedad a vacío para dar el dihidrocloruro del A-35512 factor B y las siguientes mezclas enriquecidas de factores:

15

<u>Fracciones</u>	<u>Volumen (litros)</u>	<u>Factor(es)</u>	<u>Peso</u>
1-10	120	A + H	192 g
11-24	216	B	269 g
25-31	168	B + C	590 g
32-44	312	C, E, F, G	224 g

20 E. Purificación del A-35512 factor B

Se disuelven 400 g del dihidrocloruro del A-35512 factor B parcialmente purificado, obtenido como se ha descrito en la Sección D, en 1,2 litros de metanol acuoso al 50 % y se cromatografía en una columna de alúmina preparada como sigue:

25 Se agitan 10 kg de óxido de aluminio ácido (M. Woelm) en una solución acuosa de metanol al 50 %. Después de dejar la mezcla en reposo, se decanta la solución que sobrenada y se desprecia. De nuevo se agita la alúmina con metanol acuoso  
30 al 50 % y se introduce en una columna con un diámetro de

1 13,5 cm. La columna de alúmina se lava con metanol acuoso al 50 % hasta que se obtiene un efluente transparente.

5 La columna se eluye con metanol acuoso al 50 % a un caudal de unos 8-10 ml/minuto, recogiendo fracciones de un volumen de 240-300 ml aproximadamente. Las fracciones se exploran por bioautografía en capa fina como se ha descrito en el Ejemplo 5. Basándose en estos datos, se combinan las fracciones para dar el dihidrocloruro de A-35512 factor B purificado, como sigue:

10

<u>Fracciones</u>	<u>Peso</u>
17-21	9,6 g
22-29	72,0 g
30-37	117,0 g

15 Cada una de estas fracciones se cristaliza en una solución concentrada en metanol acuoso al 50 %, a 4°C. El dihidrocloruro del A-35512 factor B así purificado contiene alrededor de 4,6 % de cloro. Una solución del dihidrocloruro del A-35512 factor B en dimetilformamida acuosa al 66 % tiene un pH de 6,5 aproximadamente.

20 EJEMPLO 2

25 El medio vegetativo incubado preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1, Sección A, puede ser almacenado alternativamente para su uso posterior, manteniéndolo en la fase de vapor del nitrógeno líquido mediante el siguiente procedimiento:

30 En un pequeño tubo tapado a rosca y esterilizado (13 x 100 mm), se introducen 2 ml de un agente suspensor de la siguiente composición:

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad</u>
Glicerol	20 %
Lactosa	10 %
Agua desionizada	70 %

5 A este agente suspensor se agregan 2 ml de un medio vegetativo incubado durante 48 horas, preparado como se ha descrito antes. La solución mezclada se congela y se mantiene en la fase gaseosa de un tanque de nitrógeno líquido.

10 El medio vegetativo así almacenado se descongela para uso en una fermentación en matraces sacudidos o en tanques, colocando el vial en un baño de agua a 43°C. Se utiliza 1 ml de la solución descongelada del vial para inocular 50 ml de un medio vegetativo que tiene la misma composición que en el Ejemplo 1, Sección A. El medio vegetativo inoculado se utiliza, como se ha descrito en el Ejemplo 1, para la fermentación en matraces sacudidos o para formar un inoculum mayor para la fermentación en tanque.

EJEMPLO 3

20 Se realiza la fermentación por el método del Ejemplo 1 pero utilizando un medio de producción en matraces sacudidos/tanques de la siguiente composición:

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad (g/l)</u>
Dextrina de tapioca	75,0
Melaza	40,0
25 Peptona soluble de carne	15,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
CaCO <sub>3</sub>	2,0
Agua c.s. para	1 litro.

EJEMPLO 4

Preparación de la aglicona del A-35512 B

1  
5  
10  
Se disuelven 5,0 g del dihidrocloruro del A-35512 factor B, obtenido como se ha descrito en el Ejemplo 1, Sección E, en 200 ml de agua. Esta solución se acidula con 14 ml de ácido clorhídrico 4N. La solución resultante se calienta a reflujo durante 2 horas. Después se enfría la solución y se evapora a vacío hasta 3/4 de su volumen original. Se añade gota a gota ácido clorhídrico 6N a esta solución hasta que la precipitación es completa. El precipitado resultante se separa por filtración y se seca para dar 3,56 g del hidrocloreuro de la aglicona del A-35512 B crudo.

15  
El filtrado se concentra y analiza. El filtrado contiene glucosa, fucosa, manosa y ramnosa.

20  
25  
La aglicona del A-35512 B cruda se purifica por cromatografía en alúmina lavada con ácido (Woelm, Grado I) utilizando un sistema disolvente de agua/metanol (1:9). La elución de la columna se estudia mediante cromatografía en capa fina de celulosa. Se combinan las fracciones eluidas que contienen la aglicona del A-35512 B y se evaporan a vacío para dar 398 mg del producto parcialmente purificado. Los resultados de la comparación cromatográfica en capa fina, utilizando una pulverización de ninhidrina para la detección, confirman que todavía hay presentes impurezas no bioactivas.

30  
Se purifican 100 mg de esta aglicona de A-35512 B parcialmente purificada mediante cromatografía sobre poliamida (4 g, Machery, Nagel & Co. MN-SC-6, distribuida por Brinkmann Instruments Co. <0,07 mm), eluyendo con agua. Esta columna también se explora por cromatografía en capa fina de celulosa como se ha descrito anteriormente. Las fracciones eluidas que

1 contienen la aglicona del A-35512 factor B se combinan y lio-  
filizan para dar 64 mg del hidrocioruro de aglicona del  
A-35512 factor B purificado. (Rendimiento total: 5,08 % a  
partir del A-35512 factor B inicial).

5 EJEMPLO 5

Preparación de la aglicona del A-35512 factor B en forma de  
base libre

10 Se disuelven 90 mg del hidrocioruro de la aglicona del  
A-35512 factor B, obtenido como se ha descrito en el Ejemplo  
4, en 30 ml de metanol-agua 1:1. Esta solución se neutraliza  
con 3,5 ml de resina cambiadora de ion [ Bio-Rad AG-3-4X  
(OH<sup>-</sup>) ]. La solución resultante se agita durante 15 minutos  
a la temperatura ambiente. Después se separa la resina por  
15 filtración. El filtrado se concentra a vacío, manteniendo la  
temperatura por debajo de 60°C, hasta la mitad de su volumen  
aproximadamente y después se liofiliza para dar 68 mg de la  
aglicona del A-35512 factor B, en forma de base libre.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita de-  
berá recaer sobre las siguientes:

20 REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción del derivado  
aglicona del A-35512 factor B, caracterizado por:

- 25 a) cultivar Streptomyces candidus NRRL 8156 o un mutante del  
mismo productor de A-35512 en un medio de cultivo que con-  
tenga fuentes asimilables de hidrato de carbono, nitróge-  
no y sales inorgánicas, en condiciones de fermentación  
aerobia sumergida, hasta que se ha producido una cantidad  
sustancial de actividad antibiótica;
- 30 b) separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cultivo;
- c) aislar el antibiótico A-35512 factores A, B, C, E, F, G y

1

H de la mezcla antibiótica A-35512 y

d) preparar la aglicona del antibiótico A-35512 factor B a partir del antibiótico A-35512 factor B.

5

2.- Se reivindica por último como objeto que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL DERIVADO AGLICONA DEL A-35512 FACTOR B.

10

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de treinta y una páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

15

Madrid, 23 de Mayo de 1.977.

BERNARDO UNGRIA

P.P.



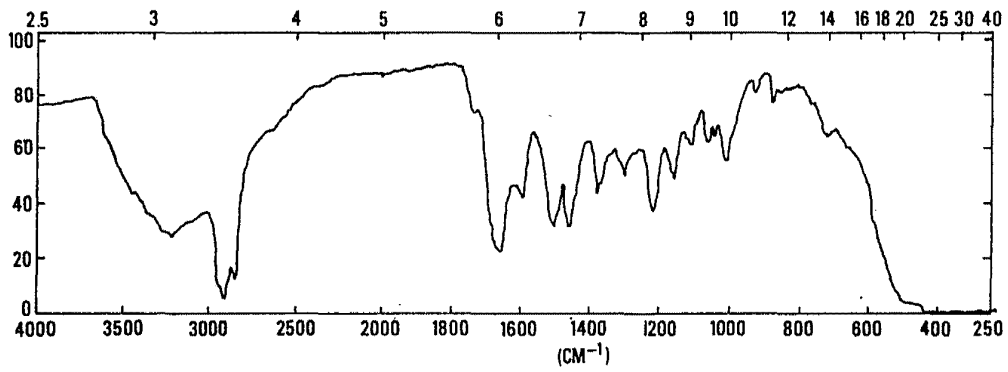
20

25

~~30~~

30

**POOR  
QUALITY**



ESCALA VARIABLE

Madrid, 23 de Mayo de 1.977

BERNARDO UNGRIA

P.D.