

IN.~



ESPAÑA

19 ES	11 21	NUMERO <b>459052</b>	10 AI
	22	FECHA DE PRESENTACION 23-5-1.977	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
689.274	24-5-1.976	Estados Unidos

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D, A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE LA MEZCLA ANTIBIOTICA A-35512

71 SOLICITANTE (S)
ELI LILLY AND COMPANY

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
307 East McCarty Street - Indianapolis, Indiana - Estados Unidos

72 INVENTOR (ES)
Karl Heinz Michel, de nacionalidad alemana, el cual ha cedido sus derechos a la entidad solicitante

73 TITULAR (ES)
El mismo solicitante

74 REPRESENTANTE
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

**POOR  
QUALITY**

1           La mezcla antibiótica A-35512 que contiene los factores  
A, B, C, E, F, G y H relacionados, microbiológicamente acti-  
vos, se produce por fermentación aerobia sumergida de un nue-  
vo Streptomyces candidus NRRL 8156. Los factores A-35512 in-  
5           dividuales se separan y aíslan por cromatografía. Los anti-  
bióticos A-35512 son agentes antibacterianos y promotores  
del crecimiento y aumentan la eficacia de utilización del  
pienso en los rumiantes y en las aves. Además, el A-35512  
factor B es útil en el tratamiento de la caries dental y  
10           del acné.

          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  
15           de antibióticos que contienen grupos péptidos entre los que  
se encuentran la vancomicina (patente estadounidense número  
3.067.099), A-4696 A, B y C (patente estadounidense número  
2.952.095), avoparcina (patente estadounidense nº3.855.410),  
ristomicina A (Lomakina, N., Séptimo Simposio Internacional  
20           de Química de Productos Nacionales, Riga, Latvia, pág. 625,  
1970) y ristocetina A (patente estadounidense nº 2.990.329).  
Los antibióticos A-35512 difieren de estos antibióticos cono-  
cidos, por ejemplo, en el movimiento en diversos sistemas  
cromatográficos y en el contenido en aminoácidos y azúcares.  
25           El derivado aglicona del A-35512 factor B está descrito en  
la solicitud de patente copendiente titulada "Un procedimien-  
to para la producción del derivado aglicona del A-35512 fac-  
tor B", presentada en esta misma fecha.

30           Aunque actualmente se conocen muchos agentes antibacte-  
rianos, continúa la necesidad de nuevos antibióticos mejora-

1 dos. Un problema en la terapia actual con antibióticos es la  
diferencia de eficacia contra los organismos patógenos. Otro  
problema es el hecho de que continuamente se desarrollan ce-  
pas de organismos que son resistentes a los antibióticos  
5 actualmente utilizados. Todavía otro problema es el hecho de  
que los pacientes individuales con frecuencia presentan gra-  
ves reacciones a ciertos antibióticos específicos, debidas a  
hipersensibilidad y/o a efectos tóxicos. Debido a estos proble-  
mas en la terapia actual, un objeto de esta invención es pro-  
10 porcionar nuevos antibióticos para uso contra las enfermeda-  
des causadas por los microorganismos.

Otro objeto de esta invención es proporcionar herramien-  
tas adicionales para aumentar la eficacia del pienso de los  
animales rumiantes y de las aves. A medida que aumenta la ne-  
cesidad de alimentos, la eficacia de los piensos adquiere ca-  
15 da vez mayor importancia. El dietilestilbestrol y otros es-  
trógenos han aumentado la eficacia del pienso en diversos ani-  
males y aves. Ha surgido la preocupación sobre el riesgo de  
consumir residuos de estos aditivos de los piensos que perma-  
necen en la carne en el momento de su consumo. Existe una ne-  
cesidad económica muy real de nuevas formas de aumentar la  
20 eficacia de los abastecimientos limitados de piensos en la  
producción de carne de animales rumiantes y aves. La mezcla  
antibiótica A-35512, sus factores y sus derivados constituyen  
25 pasos en esa dirección.

Esta invención también proporciona un procedimiento de  
producción de la mezcla antibiótica A-35512 caracterizada por  
los factores A, B, C, E, F, G y H y de los antibióticos  
A-35512 factor A, A-35512 factor B, A-35512 factor C, A-35512  
30 factor E, A-35512 factor F, A-35512 factor G y A-35512 fac-

1 tor H, cuyo procedimiento se caracteriza por:

- 5 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, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones de fermentación aerobia sumergida, hasta que se ha producido una cantidad sustancial de actividad antibiótica;
- 10 b) opcionalmente, separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cultivo y
- c) opcionalmente, aislar los factores A, B, C, E, F, G y H del antibiótico A-35512 de la mezcla antibiótica A-35512.

15 El número y la proporción de los factores individuales coproducidos en esta mezcla antibiótica varía con las condiciones de fermentación utilizadas. Las sustancias antibióticas de esta invención son denominadas arbitrariamente aquí antibióticos A-35512. El factor B es el principal factor de la mezcla A-35512. Los factores A-35512 aparecen en la mezcla A-35512 y son recuperados individualmente de la mezcla en forma de sus hidroccloruros. Cada factor individual puede ser

20 convertido en su base libre (exenta de cloro iónico), por ejemplo por cromatografía sobre una resina cambiadora de ion débilmente básica. Además de la base libre del hidroccloruro, también son útiles otras sales farmacéuticamente aceptables de los factores A-35512. En las discusiones de utilidad, se

25 utilizará el término "compuesto A-35512" por razones de brevedad para denotar un compuesto seleccionado entre el grupo formado por los factores, A, B, C, E y H del A-35512 y sus sales farmacéuticamente aceptables.

30 El espectro de absorción infrarrojo (en pastilla de bromuro potásico) de los siguientes factores A-35512 se encuentra

1 en los dibujos que acompañan a esta memoria como sigue:

Figura 1 - dihidrocloruro del A-35512 factor A

Figura 2 - dihidrocloruro del A-35512 factor B

Figura 3 - hidrocioruro del A-35512 factor H

5 Figura 4 - dihidrocloruro del A-35512 factor C

Figura 5 - hidrocioruro del A-35512 factor E.

Los factores A-35512 de esta invención son compuestos estrechamente relacionados. Hasta 7 factores antibióticos se recuperan de la fermentación como mezcla antibiótica A-35512. Los factores individuales se separan uno de otro y los factores A, B, C, E y H se aíslan como compuestos individuales en la forma descrita más adelante. La mezcla A-35512 es soluble en agua; parcialmente soluble en alcoholes como metanol y etanol pero insoluble en otros disolventes orgánicos como benceno, cloroformo, acetona, éter dietílico, acetato de etilo, tolueno, hexano, acetonitrilo y dioxano.

15

A-35512 factor A

20

El A-35512 factor A es un compuesto básico, amorfo, blanco. El A-35512 factor A tiene la siguiente composición elemental porcentual aproximada:

Carbono, 54,29 %

Hidrógeno, 5,19 %

Nitrógeno, 5,58 %

Oxígeno, 33,76 %

25

Cloro, 1,69 %.

El dihidrocloruro del A-35512 factor A es un compuesto higroscópico, amorfo, blanco. El dihidrocloruro del A-35512 factor A tiene la siguiente composición elemental porcentual media:

30

Carbono, 51,03 %

1            Hidrógeno, 5,10 %  
              Nitrógeno, 4,75 %  
              Oxígeno, 34,20 %  
              Cloro, 4,80 %.

5            El espectro de absorción infrarrojo del dihidrocloruro del A-35512 factor A en pastilla de bromuro potásico está indicado en la Figura 1 de los dibujos que acompañan a esta memoria. Los máximos de absorción más significativos aparecen a las siguientes frecuencias ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3405 (intenso), 3300 (hombro), 2950 (débil), 1750 (débil), 1670 (intenso), 1625 (hombro), 1602 (intenso), 1520 (intenso), 1470 (débil), 1440 (débil), 1405 (débil), 1345 (hombro), 1312 (medio), 1225 (medio), 1180 (débil), 1130 (débil), 1080 (intenso) y 1020 (hombro).

10           El espectro de absorción ultravioleta (UV) del dihidrocloruro del A-35512 factor A presenta, en metanol ácido y neutro, un máximo de absorción de 283 nm ( $\epsilon 11700$ ) y, en metanol básico, un máximo de absorción de 292 nm ( $\epsilon 14000$ ), calculado utilizando un peso molecular de 2000. El espectro UV del dihidrocloruro del A-35512 factor A también presenta absorción terminal a 225 nm.

15           El espectro de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  del dihidrocloruro del A-35512 factor A en  $\text{D}_2\text{O}$  tiene las siguientes características:

20

<u>n°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
25            3	175,3	0,8
4	173,0	2,1
5	172,1	2,0
6	171,4	1,5
7	170,9	2,7
30            8	170,5	2,3

	<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	9	169,5	1,6
	10	159,0	1,3
	11	157,9	2,3
5	12	156,2	2,6
	13	155,6	2,3
	14	155,3	2,4
	15	154,4	1,1
	16	136,3	1,4
10	17	136,0	1,0
	18	135,1	1,4
	19	133,5	1,2
	20	129,6	1,6
	21	129,1	1,7
15	22	128,7	1,8
	23	127,5	1,0
	24	126,0	1,4
	25	124,3	2,8
	26	122,1	1,6
20	27	109,9	1,3
	28	107,4	1,6
	29	101,7	0,9
	30	77,6	3,8
	31	76,3	4,6
25	32	75,5	2,6
	33	74,8	2,5
	34	74,5	2,4
	35	73,4	3,7
	36	72,8	6,0
30	37	72,0	4,4

	<u>Nº</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	38	70,9	7,0
	39	69,6	2,8
	40	67,4	90,9*
5	41	65,4	1,7
	42	61,7	3,1
	43	56,7	1,7
	44	55,5	1,3
	45	54,7	0,8
10	46	24,6	0,9
	47	19,1	1,7
	48	17,9	2,0
	49	17,2	1,9
	50	16,7	3,2
15	51	16,2	3,0

\* Patrón de dioxano.

El dihidrocloruro del A-35512 factor A tiene las siguientes rotaciones específicas:

$$[\alpha]_D^{25} -100 \text{ (c = 1, agua)}$$

$$[\alpha]_{365}^{25} -400 \text{ (c = 1, agua).}$$

La valoración electrométrica del dihidrocloruro del A-35512 factor A en dimetilformamida acuosa al 66 % indica la presencia de cuatro grupo valorables con valores  $pK_a$  de 7,35, 9,09, 10,49 y 12,44 aproximadamente (pH inicial 6,2).

El peso molecular aparente del dihidrocloruro del A-35512 factor A, determinado por valoración, es alrededor de 2106.

El dihidrocloruro del A-35512 factor A es soluble en agua, parcialmente soluble en alcoholes como metanol y etanol pero generalmente insoluble en otros disolventes orgá-

1 nicos como benceno, cloroformo, acetona, éter dietílico, acetato de etilo, tolueno, hexano, acetonitrilo y dioxano.

5 El dihidrocloruro del A-35512 factor A es estable durante 72 horas en soluciones acuosas a un pH de 3 a 10 aproximadamente.

El análisis de aminoácidos del dihidrocloruro del A-35512 factor A hidrolizado con ácido indica que el A-35512 factor A contiene como mínimo cinco restos aminoácidos, uno de los cuales es la glicina.

10 A-35512 factor B

El A-35512 factor B es un compuesto básico, amorfo, 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 tiene la siguiente composición elemental porcentual media:

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

20 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 empírica preferida es  $C_{98}H_{103}N_8O_{47}Cl$  (calculado: C, 54,00; H, 4,75; N, 5,15; O, 34,50; Cl, 1,60).

25 El espectro de absorción ultravioleta (UV) del A-35512 factor B presenta, en metanol ácido y neutro, un máximo de absorción de 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.

30

1 El A-35512 factor B tiene las siguientes rotaciones específicas:

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

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

5 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.

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

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

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

Carbono, 52,57 %

Hidrógeno, 4,80 %

Nitrógeno, 5,66 %

25 Oxígeno, 32,86 %

Cloro, 4,51 %.

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

30 El espectro UV del dihidrocloruro del A-35512 factor

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

5 El dihidrocloruro del A-35512 factor B tiene las siguientes rotaciones específicas:

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

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

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

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

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

<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
2	173,0	4,1
3	171,9	3,7
4	171,6	3,3
5	171,0	5,8
6	170,8	5,0
7	169,6	3,6
8	159,0	4,1
9	157,9	4,4
30 10	157,5	3,7

	<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	11	156,6	4,8
	12	155,6	6,1
	13	155,3	4,2
5	14	154,9	3,3
	15	154,3	4,2
	16	151,7	3,3
	17	144,3	3,1
	18	136,7	3,5
10	19	136,2	4,9
	20	135,4	4,0
	21	135,2	4,4
	22	133,6	4,2
	23	133,3	4,1
15	24	129,8	1,7
	25	129,3	3,0
	26	128,8	2,6
	27	127,6	1,5
	28	126,1	3,9
20	29	124,2	5,6
	30	122,4	1,4
	31	122,0	4,4
	32	120,7	3,3
	33	116,5	2,7
25	34	109,5	0,8
	35	108,2	1,1
	36	107,7	2,7
	37	104,5	1,7
	38	101,8	2,9
30	39	100,9	1,6

	<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	40	98,2	1,0
	41	76,9	1,2
	42	76,1	1,8
5	43	74,1	2,0
	44	73,5	2,7
	45	72,7	2,4
	46	72,3	4,0
	47	71,0	7,1
10	48	70,3	2,5
	49	69,7	2,5
	50	67,4	74,7*
	51	64,6	1,2
	52	62,0	1,5
15	53	58,0	1,3
	54	56,8	1,7
	55	55,4	3,9
	56	54,3	2,5
	57	24,5	2,0
20	58	17,9	3,0
	59	17,2	2,0
	60	16,3	2,5

\* Patrón de dioxano.

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):

30

**POOR  
QUALITY**

	<u>d</u>	<u>Intensidad relativa</u>
1	17,15	100
	12,90	80
	10,85	70
5	9,25	70
	8,87	60
	8,22	50
	7,86	50
	6,93	40
10	6,20	40
	5,62	40
	5,04	05
	4,02	02
	3,54	02

15

El espectro de absorción infrarrojo del dihidrocloruro del A-35512 factor B en pastilla de bromuro potásico está mostrado en la Figura 2 de los dibujos que acompañan a esta memoria. Los máximos de absorción más indicativos aparecen en 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).

20

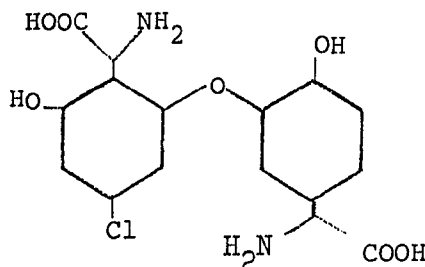
25

El análisis de aminoácidos del dihidrocloruro del A-35512 factor B hidrolizado con ácido indica que el A-35512 factor B contiene por lo menos cinco restos aminoácidos, uno de los cuales es la glicina. Los cuatro restos aminoácidos restantes en el A-35512 factor B son complejos y parecen ser idénticos a los encontrados en el A-35512 factor A. La

30

1 estructura de uno de estos restos aminoácidos parece ser la  
siguiente:

5



10

El análisis de sus productos de hidrólisis ácida indica 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 hidrólisis ácida suave del dihidrocloruro del A-35512 factor B separa los grupos glucosa, fucosa, manosa y ramnosa para dar el derivado aglicona característico.

15

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

20

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

25

El dihidrocloruro del A-35512 factor B es estable durante 72 horas en soluciones acuosas a un pH de 3 a 10 aproximadamente.

#### A-35512 factor C

30

El A-35512 factor C es un compuesto básico, amorfo, blanco. El A-35512 factor C tiene la siguiente composición porcentual aproximada:

Carbono, 53,93 %

Hidrógeno, 5,15 %

Nitrógeno, 5,80 %

Oxígeno, 32,35 %

Cloro, 1,90 %.

Esta composición elemental concuerda con una fórmula empírica preferida de  $C_{84}H_{99}N_8O_{38}Cl$ . El A-35512 factor C tiene un peso molecular aproximado de 1862.

El dihidrocloruro del A-35512 factor C es un compuesto amorfo blanco. El dihidrocloruro del A-35512 factor C tiene la siguiente composición elemental porcentual aproximada:

Carbono, 51,76 %

Hidrógeno, 5,07 %

Nitrógeno, 5,61 %

Oxígeno, 30,29 %

Cloro, 4,88 %.

La fórmula empírica del dihidrocloruro del A-35512 factor C es del siguiente orden:  $C_{83-85}H_{97-101}N_8O_{37-39}Cl_3$ .

La composición elemental concuerda especialmente con otra fórmula empírica preferida  $C_{84}H_{97}N_8O_{38}Cl \cdot 2HCl$  (Calculado: C, 52,2 %; H, 5,1 %; N, 5,8 %; O, 31,5 %; Cl, 5,4 %).

El espectro de absorción infrarrojo del dihidrocloruro del A-35512 factor C en pastilla de bromuro potásico está indicado en la Figura 4 de los dibujos que acompañan a esta memoria. Los máximos de absorción más significativos aparecen a las siguientes frecuencias ( $cm^{-1}$ ): 3370 (intenso), 3280 (hombro), 3040 (hombro), 2980 (hombro), 2920 (débil), 1740 (débil), 1658 (intenso), 1620 (débil), 1589 (medio), 1503 (intenso), 1460 (débil), 1428 (medio), 1385 (débil), 1330 (débil), 1295 (medio), 1210 (intenso), 1162 (medio), 1120 (débil), 1060 (intenso) y 1005 (medio).

1

El espectro de absorción ultravioleta del dihidrocloruro del A-35512 factor C presenta, en metanol ácido y neutro, un máximo de absorción a 282 nm ( $\epsilon$ 14600) y, en metanol básico, un máximo de absorción a 292 nm ( $\epsilon$ 16400), calculado utilizando un peso molecular de 2000.

5

El espectro de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  del dihidrocloruro del A-35512 factor C en  $\text{D}_2\text{O}$  tiene las siguientes características:

10

<u>Nº</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	172,9	2,5
2	172,2	2,0
3	171,5	2,2
4	171,0	3,9
5	169,6	2,0
6	158,6	1,8
7	157,8	3,0
8	156,5	2,1
9	156,1	2,8
10	155,6	4,2
11	154,6	3,9
12	151,1	1,5
13	143,3	1,4
14	136,0	3,2
15	135,4	2,7
16	133,2	3,7
17	128,7	2,3
18	126,5	3,1
19	124,6	2,1
20	129,3	2,7
21	121,5	2,2

15

20

25

30

	<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	22	120,1	1,2
	23	118,0	1,7
	24	116,5	1,2
5	25	107,8	2,7
	26	104,5	1,9
	27	101,7	1,9
	28	94,5	1,0
	29	75,9	3,0
10	30	74,3	2,0
	31	73,4	2,3
	32	72,1	3,5
	33	70,9	4,3
	34	68,7	2,9
15	35	67,4	71,7*
	36	64,3	1,3
	37	62,2	1,6
	38	56,1	1,4
	39	55,2	3,5
20	40	54,2	2,1
	41	24,3	1,9
	42	17,9	2,2
	43	17,1	2,0
25	44	16,2	2,0

\* Patrón de dioxano.

El dihidrocloruro del A-35512 factor C tiene las siguientes rotaciones específicas:

$$[\alpha]_D^{25} -161^\circ \text{ (c = 1,05, agua)}$$

$$[\alpha]_{365}^{25} -614^\circ \text{ (c = 1,05, agua).}$$

30

1 La valoración electrométrica del dihidrocloruro  
del A-35512 factor C en dimetilformamida acuosa al 66 % in-  
dica la presencia de tres grupos valorables con valores  $pK_a$   
de 7,30, 8,92 y 10,99 aproximadamente y la posible presencia  
5 de dos o más grupos con valores  $pK_a$  mayores de 11,5.

El peso molecular aparente del dihidrocloruro del  
A-35512 factor C, determinado por valoración, es alrededor  
de 1982.

10 El análisis de aminoácidos del dihidrocloruro del  
A-35512 factor C hidrolizado con ácido indica que contiene  
por lo menos cinco restos aminoácidos, uno de los cuales pa-  
rece ser glicina. Los cuatro restos aminoácidos restantes  
todavía no han sido identificados.

15 El dihidrocloruro del A-35512 factor C es soluble  
en agua, dimetilsulfóxido y dimetilformamida acuosa, parcial-  
mente soluble en alcoholes como metanol y etanol e insoluble  
en otros disolventes orgánicos menos polares, como benceno,  
cloroformo, acetona, éter dietílico, acetato de etilo, to-  
lueno, hexano, acetonitrilo y dioxano.

20 El dihidrocloruro del A-35512 factor C es estable  
en soluciones acuosas a un pH de 3 a 10 aproximadamente du-  
rante 146 horas.

A-35512 factor E

25 El A-35512 factor E es un compuesto básico amor-  
fo, blanco. El A-35512 factor E tiene la siguiente composi-  
ción elemental porcentual aproximada:

Carbono, 54,84 %

Hidrógeno, 4,73 %

Nitrógeno, 5,26 %

30 Oxígeno, 32,67 %

1 Cloro, 1,72 %.

El hidrocioruro del A-35512 factor E es un compuesto amorfo blanco. El hidrocioruro del A-35512 factor E tiene la siguiente composición elemental porcentual aproximada:

5 Carbono, 52,67 %

Hidrógeno, 4,59 %

Nitrógeno, 5,55 %

Oxígeno, 33,51 %

Cloro, 3,62 %.

10 El espectro de absorción infrarrojo del hidrocioruro del A-35512 factor E en pastilla de bromuro potásico está indicado en la Figura 5 de los dibujos que acompañan a esta memoria. Los máximos de absorción más significativos aparecen a las siguientes frecuencias ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3360 (intenso), 3220 (hombro), 2900 (débil), 1725 (débil), 1650 (intenso), 1580 (medio), 1498 (intenso), 1450 (débil), 1419 (débil), 1295 (medio), 1205 (medio), 1172 (medio), 1110 (débil), 1060 (intenso) y 1000 (débil).

20 El espectro de absorción ultravioleta del hidrocioruro del A-35512 factor E presenta los siguientes máximos de absorción: en metanol neutro, 270 nm (hombro) y 359 nm ( $\epsilon 16216$ ) en metanol ácido, 286 nm ( $\epsilon 18018$ ) y 310 nm (hombro); en metanol básico, 270 nm (hombro), 300 nm ( $\epsilon 16216$ ) y 354 nm ( $\epsilon 17568$ ), calculados utilizando un peso molecular de 2000.

25 El hidrocioruro del A-35512 factor E tiene la siguiente rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} -108,3$  ( $c = 1$ , agua).

30 La valoración electrométrica del hidrocioruro del A-35512 factor E en dimetilformamida acuosa al 66 % indica la presencia de tres grupos valorables con valores  $\text{pK}_a$  de 6,30, 9,09 y 11,62 aproximadamente y la posible presencia de uno o

1 dos grupos con valores  $pK_a$  de 12,5 aproximadamente o mayores (pH inicial 5,45).

5 El peso molecular aparente del hidrocioruro del A-35512 factor E, determinado por valoración, es aproximadamente 2018.

El análisis de aminoácidos del hidrocioruro del A-35512 factor E hidrolizado con ácido indica que el A-35512 factor E contiene seis restos aminoácidos todavía no identificados.

10 El hidrocioruro del A-35512 factor E es soluble en agua, parcialmente soluble en alcoholes como metanol y etanol pero insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos como benceno, cloroformo, acetona, éter dietílico, acetato de etilo, tolueno, hexano, acetonitrilo y dioxano.

15 A-35512 factor H

El A-35512 factor H es un compuesto básico amorfo, blanco. El A-35512 factor H tiene la siguiente composición elemental porcentual aproximada:

20 Carbono, 53,76 %  
Hidrógeno, 5,32 %  
Nitrógeno, 5,53 %  
Oxígeno, 33,48 %  
Cloro, 1,59 %.

25 El A-35512 factor H tiene una fórmula empírica del orden de  $C_{85-87}H_{103-107}N_8O_{38-40}Cl$ , una fórmula empírica tentativa preferida de  $C_{86}H_{104}N_8O_{39}Cl$  y un peso molecular aproximado de 1908.

30 El hidrocioruro del A-35512 factor H es un compuesto higroscópico amorfo, blanco, El hidrocioruro del A-35512 factor H tiene la siguiente composición elemental porcentual pro-

1

media:

Carbono, 53,10 %

Hidrógeno, 5,37 %

Nitrógeno, 5,35 %

5

Oxígeno, 30,12 %

Cloro, 3,78 %

10

El espectro de absorción infrarrojo del hidrocloreuro del A-35512 factor H en pastilla de bromuro potásico se encuentra en la Figura 3 de los dibujos que acompañan a esta memoria. Los máximos de absorción más significativos aparecen a las siguientes frecuencias ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3410 (intenso), 3240 (hombro), 2940 (débil), 1670 (intenso), 1630 (hombro), 1605 (intenso), 1520 (intenso), 1470 (débil), 1442 (débil), 1400 (débil), 1345 (hombro), 1310 (medio), 1225 (medio), 1180 (débil), 1135 (débil), 1080 (intenso) y 1020 (hombro).

15

El espectro de absorción ultravioleta del hidrocloreuro del A-35512 factor H, presenta, en metanol ácido y neutro, un máximo de absorción a 282 nm ( $\epsilon 12500$ ) y, en metanol básico, un máximo de absorción a 292 nm ( $\epsilon 14000$ ), calculado utilizando un peso molecular de 2000. El espectro UV del hidrocloreuro del A-35512 factor H también presenta absorción terminal a 225 nm.

20

25

El espectro de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  del hidrocloreuro del A-35512 factor H en  $\text{D}_2\text{O}$  tiene las siguientes características:

<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
2	177,2	2,7
3	171,6	5,2
4	170,9	5,8
5	169,6	4,7

30

	<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	6	158,9	3,1
	7	157,6	4,3
	8	156,6	3,8
5	9	155,6	4,1
	10	155,4	3,8
	11	154,3	2,4
	12	151,3	1,6
	13	137,7	2,0
10	14	136,7	2,2
	15	136,0	4,0
	16	135,3	1,9
	17	133,5	5,0
	18	129,4	3,7
15	19	127,3	1,3
	20	126,1	3,2
	21	124,2	6,9
	22	122,6	4,1
	23	107,6	2,7
20	24	101,8	1,8
	25	76,2	2,8
	26	73,5	4,4
	27	72,3	7,4
	28	71,0	12,2
25	29	69,7	4,6
	30	67,4	73,1*
	31	61,6	3,5
	32	56,8	1,8
	33	55,4	2,8
30	34	55,0	1,5

	<u>N°</u>	<u>ppm</u>	<u>Altura (%)</u>
1	35	24,5	2,6
	36	37,9	4,6
	37	17,2	2,6
5	38	16,3	3,6

\* Patrón de dioxano.

El hidrocloreuro del A-35512 factor H tiene la siguiente rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} -123,5^\circ$  (c = 1, agua).

10 La valoración electrométrica del hidrocloreuro del A-35512 factor H en dimetilformamida acuosa al 66 % indica la presencia de cinco grupos valorables con valores  $pK_a$  de 5,0, 7,46, 9,80, 11,43 y 13,02 aproximadamente (pH inicial 5,93).

15 El peso molecular aparente del hidrocloreuro del A-35512 factor H, determinado por valoración, es aproximadamente 1660.

20 El análisis de aminoácidos del hidrocloreuro del A-35512 factor H hidrolizado por ácido indica que el A-35512 factor H contiene como mínimo cinco restos aminoácidos, de los que uno es la glicina. Los cuatro restos aminoácidos restantes en el A-35512 factor H parecen ser idénticos a los encontrados en el A-35512 factores A y B.

25 El hidrocloreuro del A-35512 factor H es soluble en agua, parcialmente soluble en alcoholes como metanol y etanol pero insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos como benceno, cloroformo, acetona, éter dietílico, acetato de etilo, tolueno, hexano, acetonitrilo y dioxano.

30 El hidrocloreuro de A-35512 factor H es estable du-

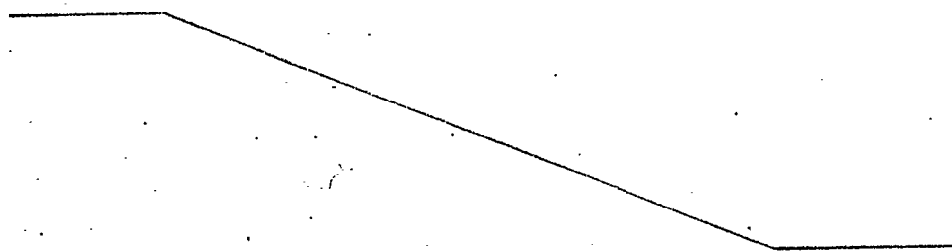
1 rante 72 horas en soluciones acuosas con un pH de 3 a 10 aproximadamente.

5 El A-35512 factores A, B, C, E y H y los factores minoritarios F y G se separan convenientemente por cromatografía de papel, 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. Los valores  $R_f$  aproximados de los factores A-35512 en este sistema se encuentran en la Tabla I.

10 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
15 Factor E.HCl	0,64
Factor F	0,81
Factor G	0,93
Factor H.HCl	0,15.

20 En varios sistemas, el A-35512 factor H tiene un perfilcromatográfico muy similar al del antibiótico AM374 (patente estadounidense 3.700.768). El antibiótico A-35512 factor H puede distinguirse del antibiótico AM374 en dos sistemas cromatográficos en papel como mínimo. Los valores  $R_f$  del A-35512 factor H.2HCl y del AM374 en estos dos sistemas se encuentran en la Tabla II.



1

TABLA II

<u>Sistema disolvente</u>	<u>Valor R<sub>f</sub></u>	
	<u>A-35512 H</u>	<u>AM374</u>
CH <sub>3</sub> OH/HCl 0,1N (3:1)	0,47	0,58
1-propanol/NH <sub>4</sub> OH/H <sub>2</sub> O (6:3:1)	0,11	0,20

5

Varios de los factores A-35512 pueden ser separados mediante cromatografía de líquidos de gran potencia (HPLC), utilizando poliamida (Z1PAX, Du Pont) como fase estacionaria y una solución acuosa de fosfato potásico monobásico 1,33M como fase móvil y detectando mediante ultravioleta (250 nm). En la Tabla III se encuentran los tiempos de retención para los factores A-35512 en una separación representativa por HPLC, utilizando las siguientes condiciones:

10

15

Tamaño de la columna: 1/8" x 6' (3,2 mm x 180 cm).

Relleno: poliamida (Z1PAX, Du Pont)

Disolvente: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (327 g)/H<sub>2</sub>O (1800 ml)

Caudal: 0,5 ml/minuto

Velocidad del gráfico: 2" (5 cm)/hora

Presión: 1500 psi (105 kg/cm<sup>2</sup>).

20

TABLA III

<u>A-35512 factor</u>	<u>Tiempo de retención, (minutos)</u>
A	9,375
B	13,125
C	26,25
E	5,625
F	7,5
G	7,5
H	7,5

25

30

Además de la base libre y del hidrocloreuro de los

1 factores A-35512 inidividuales, también forman parte de es-  
ta invención otras sales de adición de ácido farmacéuticamen-  
te aceptables del A-35512 factores A, B, C, E y H. Las sales  
"farmacéuticamente aceptables" son sales donde la toxici-  
5 dad del compuesto en conjunto frente a los animales de san-  
gre caliente no es superior que la de la forma no salina.  
Son sales representativas y adecuadas de los factores A, B,  
C, E y H del A-35512 y de la aglicona del A-35512 factor B  
las sales formadas por la reacción habitual con ácidos orgá-  
10 nicos e inorgánicos como, por ejemplo, ácidos sulfúrico, fos-  
fórico, acético, succínico, cítrico, láctico, maleico, fumá-  
rico, palmítico, cólico, pamoico, mícico, D-glutámico, d-can-  
fórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico,  
esteárico, salicílico, metanosulfónico, bencenosulfónico,  
15 sórbico, pícrico, benzoico, cinámico y similares.

Los nuevos antibióticos de esta invención son pro-  
ducidos cultivando una cepa productora de A-35512 de  
Streptomyces candidus NRRL 8156, en condiciones aerobias su-  
20 mergidas, en un medio de cultivo adecuado, hasta que se ha  
producido una actividad antibiótica sustancial. Los antibió-  
ticos se recuperan empleando diversos procedimientos de aisla-  
miento y purificación utilizados en fermentación.

El nuevo organismo útil para la preparación de los  
25 antibióticos A-35512 fué aislado de una muestra de tierra  
recogida en Eniwetok Atoll. Este organismo se ha clasificado  
con una nueva cepa de Streptomyces candidus (Krassilnikov)  
Waksman, como describe E.B. Shirling y D. Gottlieb en "Coope-  
rative Description of Type Cultures of Streptomyces. II.  
Species Descriptions from Second Study", Intern.J.Systematic  
30 Bacteriol. 18(4): 279-392 (1968) y S.A. Waksman, "The Actino-

1 mycetes. Vol. 2. Classification, Identification, and Descriptions of Genera and Species", Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1961.

5 Esta clasificación se basa en los métodos recomendados para el International Streptomyces Project (E.B. Shirling y D. Gottlieb, "Methods for Characterization of Streptomyces Species", Intern.Bull.Systematic Bacteriol. 16: 313-340 (1966)), junto con ciertos ensayos suplementarios. Los nombres de los colores fueron atribuidos de acuerdo con el método ISCC-NBS (K.L. Kelly y D.B. Judd, "The ISCC-NBS Method of Determining Colors and a Dictionary of Color Names", Departamento de Comercio de Estados Unidos Cir. 553, Washington, D.C., 1955). Las cifras entre paréntesis se refieren a la serie de colores de Tresner y Backus, [H.D. Tresner y S.J. Backus, "System of Color Wheels for Streptomyces Taxonomy", Appl. Microbiol. 11:335-338 (1963)] y las designaciones tabuladas de color están subrayadas. Los bloques de color Maerz y Paul (A. Maerz y M.R. Paul, "Dictionary of Color", McGraw-Hill, New York, N.Y., 1950) están encerrados entre corchetes. Los cultivos se realizaron a 30°C durante 14 días salvo indicación en contrario.

#### CARACTERIZACION DE LA CEPA PRODUCTORA DE A-35512

##### Morfología

25 Se producen esporóforos largos y ondulados. Las esporas, que aparecen en cadenas de 10-50, son cilíndricas y miden de 0,7 a 1,05 micras x 1,4 a 3,5 micras. En diversos medios se producen estructuras esclerotiales. También se observan ocasionalmente hifas en forma de escoba o fasciculadas. La superficie de las esporas, observada por microscopía electrónica, es lisa.

30

Características de cultivo en diversos medios

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

Medio	Características
ISP n° 2 (agar extracto de levadura-extracto de malta)	Crecimiento abundante; reverso amarillo grisáceo {11J5}; micelio aéreo y esporulación abundantes, blanco (w) <u>a</u> ; sin pigmento soluble.
ISP n° 3 (agar harina de avena)	Crecimiento moderado; reverso verde amarillento pálido {10B1}; micelio aéreo y esporulación medianos, blanco (w) <u>13ba</u> ; sin pigmento soluble; se observan cuerpos similares a esclerotias.
ISP n° 4 (agar sales inorgánicas-almidón)	Crecimiento bueno; reverso blanco ambarino {10C1}; micelio aéreo y esporulación buenos, gris amarillento (GY) <u>2dc</u> ; pigmento soluble marrón pálido; se observan cuerpos similares a esclerotias.
ISP n° 5 (agar glicerol-asparagina)	Crecimiento bueno; reverso verde amarillento pálido {10B2}; micelio aéreo y esporulación buenos, blanco (w) <u>a</u> ; sin pigmento soluble; los micelios parecen fasciculados.
Agar de Emerson	Crecimiento bueno; reverso oliva claro {14I6}; sin micelio aéreo ni esporulación; pigmento soluble marrón claro.
Agar modificado de Bennett	Crecimiento abundante; reverso amarillo moderado {11J6}; micelio aéreo y esporulación abundantes, blanco (w) <u>a</u> ; sin pigmento soluble.
Agar solución de Czapek	Crecimiento bueno; reverso verde amarillento pálido {10B1}; micelio aéreo y esporulación buenos, blanco (w) <u>b</u> ; sin pigmento soluble; el micelio aparece fasciculado.
Agar pasta de tomate-harina de avena	Crecimiento abundante; reverso amarillo grisáceo {11I5}; micelio aéreo y esporulación abundantes, blanco (w) <u>a</u> ; el micelio se "arrolla" alejándose de la superficie del agar; sin pigmento soluble.

1  
  
  
  
5  
  
  
10  
  
  
15  
  
  
  
  
20  
  
  
  
25  
  
  
  
30

Medio	Características
Agar nutritivo	Crecimiento mediano a bueno; reverso verde amarillento pálido {18D2}; micelio aéreo y esporulación buenos, blanco (w) a; pigmento soluble marrón claro.
Agar glucosa-asparagina	Crecimiento bueno; reverso verde amarillento pálido {17E1}; micelio aéreo y esporulación buenos, blanco (w) 13ba; sin pigmento soluble
Agar triptona-extracto de levadura	Crecimiento mediano; reverso blanco {10A1}; micelio aéreo y esporulación medianos, (w) b; sin pigmento soluble.
Agar tirosina	Crecimiento bueno, reverso blanco {10B2}; micelio aéreo y esporulación buenos, blanco (w) a; pigmento soluble marrón; se observan cuerpos similares a esclerótias
Agar glicerol-glicina	Crecimiento bueno; reverso blanco {10B2}; micelio aéreo y esporulación buenos, blanco (w) b; pigmento soluble marrón claro
Agar malato cálcico	Crecimiento bueno; reverso blanco {10B1}; micelio aéreo y esporulación buenos, blanco (w) a; sin pigmento soluble; medio clareado alrededor de la zona del inoculum.

El organismo fué estudiado para determinar sus propiedades fisiológicas selectivas de acuerdo con procedimientos habituales. Las propiedades observadas y las características halladas fueron las siguientes.

Propiedad observada	Características
Acción sobre la leche	Coagulación con cierta aclaración a los 14 días
Reducción de nitratos	Positiva
Producción de pigmento de melanina sobre: tubos inclinados de agar peptona-hierro	Negativa
tubos inclinados de agar tirosina	Positiva débil (pigmento al cabo de 7 días)

1	<u>Propiedad observada</u>	<u>Características</u>
	caldo de triptona- extracto de levadura	Negativa
	Licuefacción de la ge- latina	Completa a los 14 días.
5	Temperaturas requeridas:	26-30°C - crecimiento y esporula- ción buenos
	(Medio ISP n° 2: tubos inclinados de extracto de levadura-extracto de malta)	37°C - crecimiento escaso; sin micelio aéreo ni esporas 40°C - solamente crecimiento vege- tativo ligero 45°C - crecimiento nulo.

10

A continuación se indican los resultados de los ensa-  
yos de utilización de carbono realizados con el organismo  
NRRL 8156. Los símbolos utilizados para indicar la respuesta  
de crecimiento son:

15

- + = crecimiento bueno, utilización positiva
- (+) = crecimiento malo a mediano
- (-) = crecimiento débil, probablemente sin utilización
- = crecimiento nulo, utilización nula.

Fuente de carbono

20

ninguna (control negativo)	(-)	
D-glucosa (control positivo)	+	
L-arabinosa	(-)	
Sacarosa	(-)	
i-inositol	+	
D-manitol	+	
25	D-fructosa	+
	Ramnosa	(-)
	Rafinosa	(-)
	D-xilosa	(+) )

30

Ciertas características de la cepa productora de  
A-35512 de S. candidus NRRL 8156 difieren de las caracte-

1 rísticas del organismo descritas por Shirling y Gottlieb  
 {Elwood B. Shirling y David Gottlieb, "Cooperative Descrip-  
 5 tion of Type Cultures of Streptomyces III. Additional Spe-  
 cies Descriptions from First and Second Studies", Intern.J.  
Systematic Bacteriol. 18(2), 69-189 (1968)} y por Waksman  
 {S.A. Waksman, "The Actinomycetes, Classification, Identifi-  
 cation and Descriptions of Genera and Species", vol. 2,  
 The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md., 1961}. Estas  
 diferencias están compendiadas en la Tabla IV.

TABLA IV

	<u>NRRL 8156</u>	<u>Descripción publicada</u>
<u>Utilización de carbono</u>		
L-arabinosa	-	+
Ramnosa	-	+
i-inositol	+	-
<u>Licuefacción de la gelatina</u>	Completa a los 14 días	lenta
<u>Acción sobre la leche</u>	coagulación; cierta clarificación a los 14 días	Sin coagulación; buena peptonización.

20 El cultivo de Streptomyces candidus útil para la pro-  
 ducción de los antibióticos A-35512 ha sido depositado y  
 forma parte de la colección de cultivos de reserva del  
 Northern Regional Research Center, Departamento de Agricul-  
 25 tura de Estados Unidos, Agricultural Research Service, Peo-  
 ria, Illinois, 61604, donde es asequible al público bajo  
 el núm. NRRL 8156.

30 Como ocurre con otros organismos, las característi-  
 cas del cultivo productor de A-35512, Streptomyces candidus  
 NRRL 8156, están sujetas a variaciones. Por ejemplo, pueden

1 obtenerse variantes y mutantes artificiales de la cepa NRRL  
8156 por tratamiento con diversos mutágenos conocidos como  
rayos ultravioletas, rayos X, ondas de alta frecuencia, ra-  
diaciones radiactivas y productos químicos. Todas las varian-  
5 tes y mutantes naturales y artificiales que pertenezcan al  
género Streptomyces candidus y produzcan los antibióticos  
A-35512 pueden ser utilizados en esta invención.

El medio de cultivo empleado para cultivar el  
Streptomyces candidus NRRL 8156 puede ser uno cualquiera de  
10 diversos medios. Por 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  
15 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 hari-  
na de soja, la harina de sangre de cerdo, los aminoácidos  
como ácido glutámico y similares. Entre las sales inorgáni-  
cas nutrientes que pueden incorporarse a los medios de cul-  
tivo están las sales solubles habituales capaces de dar io-  
nes cinc, sodio, magnesio, calcio, amonio, cloruro, carbona-  
to, sulfato, nitrato y similares.

También deben incluirse en el medio de cultivo los  
25 elementos traza esenciales, necesarios para el crecimiento  
y desarrollo del organismo. Normalmente estos elementos tra-  
za aparecen como impurezas en los otros constituyentes del  
medio, en cantidades suficientes para responder a las nece-  
sidades de crecimiento del organismo.

30 Puede ser necesario agregar pequeñas cantidades (es

1 decir, 0,2 ml/l) de un agente antiespumante como polipropi-  
lenglicol a los medios de fermentación a gran escala, si la  
formación de espuma se convierte en un problema.

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

El organismo productor de A-35512 puede ser cultiva-  
do a temperaturas comprendidas aproximadamente entre 20° y  
40°C. Parece que la producción óptima de A-35512 ocurre a  
temperaturas de unos 30-34°C.

20 Como es costumbre en los procesos aerobios de cultivo  
sumergido, se hace pasar aire estéril a través del medio de  
cultivo. Para un crecimiento eficiente del organismo, el vo-  
lumen de aire empleado en la producción en tanque es preferi-  
blemente superior a 0,1 volúmenes de aire por volumen de me-  
25 dio de cultivo y por minuto (V/V/M). Para una producción efi-  
ciente de los antibióticos A-35512, el volumen de aire emplea-  
do en la producción en tanque es preferiblemente alrededor  
de 0,25 V/V/M.

30 La producción de los antibióticos A-35512 puede ser  
seguida durante la fermentación sometiendo a ensayo muestras

1 del caldo o de los extractos de los sólidos miceliales para  
determinar la actividad antibiótica contra organismos cono-  
cidos por su sensibilidad a los antibióticos. Un organismo  
de ensayo útil en el análisis de estos antibióticos es el  
5 Bacillus subtilis ATCC 6633. El bioanálisis se realiza pre-  
feriblemente mediante ensayo en disco de papel sobre placas  
de agar conteniendo un medio nutritivamente limitado.

Después de su producción en condiciones de fermenta-  
ción aerobia sumergida, los antibióticos A-35512 pueden ser  
10 recuperados del medio de fermentación por los métodos emplea-  
dos en este campo. La actividad antibiótica producida duran-  
te la fermentación de un organismo productor de A-35512 gene-  
ralmente aparece en el caldo filtrado. Por lo tanto, se con-  
sigue la recuperación máxima de los antibióticos A-35512 me-  
15 diante una filtración inicial para separar la masa micelial.  
El caldo filtrado puede ser purificado para dar la mezcla  
A-35512 por diversas técnicas. Una técnica preferida implica  
la adsorción del caldo filtrado sobre una columna de poliami-  
da y la elución de la columna con agua y mezclas hidroalcohó-  
20 licas. Las fracciones eluidas que presentan actividad anti-  
biótica pueden ser combinadas para dar la mezcla A-35512.  
Alternativamente, utilizando esta técnica, las fracciones  
eluidas pueden combinarse sobre la base de su comportamien-  
to cromatográfico en capa fina para dar el A-35512 factor B  
25 purificado y mezclas enriquecidas de los otros factores  
A-35512.

La purificación adicional de los factores A-35512 in-  
dividuales incluye procesos adicionales de adsorción y extrac-  
ción. Pueden utilizarse ventajosamente materiales adsorben-  
30 tes como alúmina, gel de sílice, resinas cambiadoras de ion

1 y similares.

5 Los factores A-35512 aparecen en el caldo de fermentación como hidroccloruros. El proceso preferido de separación en poliamida proporciona el A-35512 factor B y la parte restante de la mezcla A-35512 en forma de hidroccloruros. Cada factor individual puede ser convertido en su base libre, (exenta de cloro iónico) mediante procedimientos admitidos como, por ejemplo, cromatografía sobre una resina cambiadora de ion débilmente básica.

10 Alternativamente, el sólido del cultivo, incluidos los constituyentes del medio y el micelio, pueden ser utilizados sin extracción ni separación pero preferiblemente después de eliminar el agua, como fuente de los antibióticos A-35512. Por ejemplo, después de la producción de la actividad antibiótica A-35512, el medio de cultivo puede ser secado por liofilización y mezclado directamente en la premezcla de alimentación.

15 Se prepara la aglicona del A-35512 factor B por hidrólisis ácida suave del A-35512 factor B. El A-35512 factor B es el más fácilmente asequible en su forma de dihidroccloruro. Por lo tanto, el dihidroccloruro del A-35512 factor B es el material de partida preferido para la preparación de la aglicona del A-35512 factor B. También puede utilizarse el A-35512 factor B u otras sales de adición de ácidos del A-35512 factor B. La hidrólisis ácida se realiza siguiendo los procedimientos habituales. Aunque puede utilizarse uno cualquiera de diversos ácidos, el ácido clorhídrico es el preferido para la preparación de la aglicona del A-35512 factor B. Cuando se utiliza ácido clorhídrico, la aglicona del A-35512 factor B se recupera en forma de hidroccloruro.

20

25

30

1 La hidrólisis se lleva a cabo preferiblemente en agua a re-  
 flujo, durante un periodo de 1 a 2 horas aproximadamente.  
 Utilizando tiempos de reacción más largos se produce la de-  
 gradación de la aglicona para formar productos menos activos  
 5 y, más tarde, inactivos. Los tiempos de reacción óptimos pa-  
 ra las condiciones de reacción específicas pueden ser deter-  
 minados comprobando la bioactividad de partes alícuotas de  
 la mezcla de reacción.

10 La mezcla antibiótica A-35512 y los factores A, B, C,  
 E y H del antibiótico A-35512 inhiben el crecimiento de  
 ciertos organismos patógenos especialmente de las bacterias  
 Gram-positivas. Las concentraciones mínimas de inhibición  
 (CMI) a las cuales los antibióticos A-35512 factores A, B,  
 C y H inhiben a bacterias seleccionadas, como se determina  
 15 por ensayos de dilución en agar habituales, están resumidas  
 en la Tabla V.

TABLA V

Organismo de ensayo	CMI (mcg/ml)			
	A-35512 factor A.2HCl	A-35512 factor B.2HCl	A-35512 factor C.2HCl	A-35512 factor H.HCl
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	6,25	3,12	6,25	25,0
<u>Staphylococcus aureus</u> 3074	25,0	6,25	6,25	25,0
<u>Streptococcus faecalis</u>	6,25	3,12	3,12	12,5

25 En un importante aspecto, los antibióticos A-35512  
 inhiben el crecimiento de organismos que son resistentes a  
 otros antibióticos. En la Tabla VI está resumida la activi-  
 dad mediante el ensayo habitual en disco-placa de los A-35512  
 factores A, B, C, E y H (30 mcg/disco) contra organismos re-  
 presentativos. La actividad se mide como el diámetro en mi-  
 30 límetros de las zonas de inhibición observadas.

TABLA VI

Organismo de ensayo	Diámetros de las zonas (mm)			
	A-35512 factor A.2HCl	A-35512 factor B.2HCl	A-35512 factor C.2HCl	A-35512 factor E.HCl
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055 (susceptible a la penicilina G)	13,4	18,4	0	14,4
<u>Staphylococcus aureus</u> 3074 (resistente a la penicilina G)	13,2	16,8	0	14,5
<u>Staphylococcus aureus</u> 3130 (resistente a la meticilina)	14,4	18,4	0	15,4
<u>Streptococcus pyogenes</u> (Grupo A)	17,0	19,6	10,5	17,0
<u>Streptococcus</u> sp. 9960 (Grupo D)	15,5	19,4	0	16,4
<u>Diplococcus pneumoniae</u> Park I	-	-	11,0	20,0
				A-35512 factor H.HCl
				11,9
				11,6
				12,6
				16,0
				13,8
				-

1

5

10

15

20

25

30

TABLA VI

Organismo de ensayo	Diámetros de l		facto
	A-35512 factor A.2HCl	A-35512 factor B.2HCl	
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055 (susceptible a la penicilina G)	13,4	18,4	
<u>Staphylococcus aureus</u> 3074 (resistente a la penicilina G)	13,2	16,8	
<u>Staphylococcus aureus</u> 3130 (resistente a la meticilina)	14,4	18,4	
<u>Streptococcus pyogenes</u> (Grupo A)	17,0	19,6	
<u>Streptococcus</u> sp. 9960 (Grupo D)	15,5	19,4	
<u>Diplococcus pneumoniae</u> Park I	-	-	

1

5

10

15

20

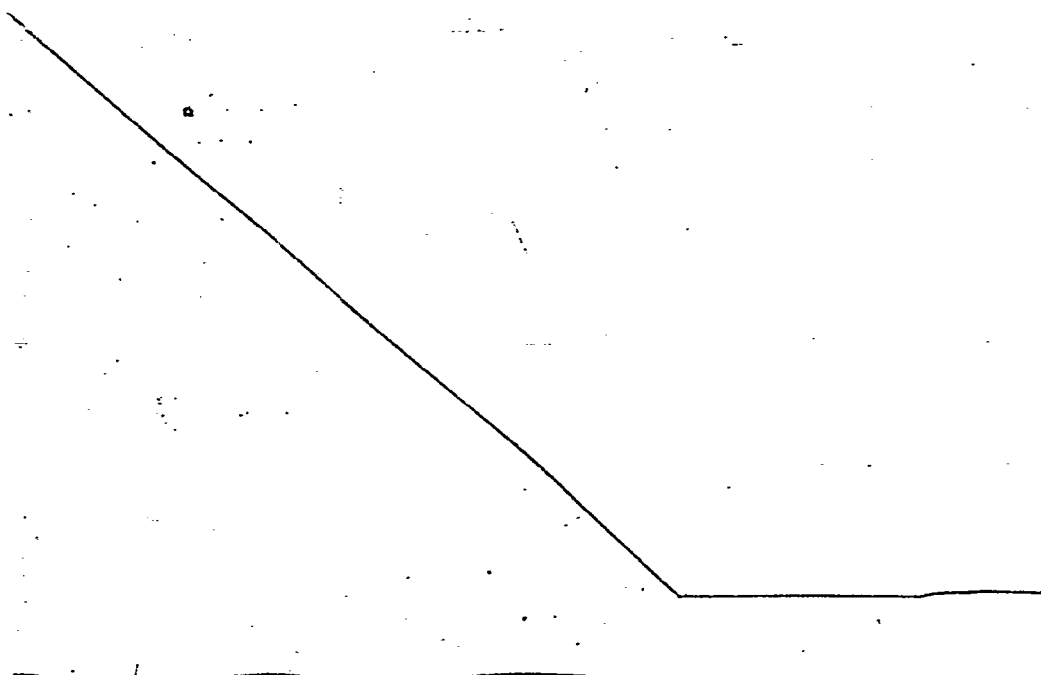
25

30

TABLA VI

Diámetros de las zonas (mm)

i	<u>A-35512</u> <u>factor B.2HCl</u>	<u>A-35512</u> <u>factor C.2HCl</u>	<u>A-35512</u> <u>factor E.HCl</u>	<u>A-35512</u> <u>factor H.HCl</u>
	18,4	0	14,4	11,9
	16,8	0	14,5	11,6
	18,4	0	15,4	12,6
	19,6	10,5	17,0	16,0
	19,4	0	16,4	13,8
		11,0	20,0	-



**POOR  
QUALITY**

1 La Tabla VII contiene resultados adicionales de ensa-  
yos de dilución en agar para el dihidrocloruro del A-35512  
factor B, dando las concentraciones mínimas de inhibición  
5 (CMI) contra diversos Streptococos del grupo A y Diplococcus  
pneumoniae.

TABLA VII

Organismo de ensayo	CMI (mcg/ml) A-35512 factor B
<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	1
" " 10389	1
" " 12344	8
" " 12961	1
" " 663-72	0,5
" " 664-72	0,5
" " 665-72	1
" " 13234	0,5
" " 19035	0,5
" " M6517	0,5
" " D27781	1
<u>Diplococcus pneumoniae</u> Park I	2
" " Tipo 14	2

15 La Tabla VIII contiene los resultados adicionales de  
ensayos de dilución en agar para el dihidrocloruro del A-35512  
factor B contra varios estreptococos del Grupo D.

TABLA VIII

Organismo de ensayo	CMI (mcg/ml) A-35512 factor B
<u>Streptococcus</u> sp. D282	2
" " 9901	2
" " 9913	4
" " 9933	4

1

TABLA VIII (continuación)

<u>Organismo de ensayo</u>	<u>CMI (mcg/ml) A-35512 factor B</u>
<u>Streptococcus</u> sp. 9960	4
" " 12253F	4
" " Shrigley	4
" " Mitis	4
" " 238	2
" " SS992	4

5

10

La Tabla IX contiene resultados adicionales de los ensayos de dilución en agar para el dihidrocloruro del A-33512 factor B contra otros organismos Gram-positivos.

TABLA IX

<u>Organismo de ensayo</u>	<u>CMI (mcg/ml) A-35512 factor B</u>
<u>Staphylococcus aureus</u> 3123*	4
" " H43**	4
" " 3124**	4
" " 3126**	2
" " 3127**	4
" " H57**	2
" " 3074**	4
" " 3130***	4
" " 3131****	4
" " 3133***	2
" " 3136***	2
" " 3125***	4
<u>Staphylococcus epidermis</u> 3064**	2
" " 3078*	2
<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	2
<u>Sarcina lutea</u> PCI-1001-FDA	1

15

20

25

30

1

\* 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.

5

Los antibióticos A-35512 también inhiben el crecimiento de ciertas bacterias anaerobias. La Tabla X resume la actividad del dihidrocloruro del A-35512 factor B contra diversas bacterias anaerobias, utilizando el ensayo normalizado de dilución en agar.

10

TABLA X

Organismo de ensayo	CMI (mcg/ml) A-35512 factor B
<u>Actinomyces israelii</u>	0,5
<u>Clostridium perfringens</u>	2,0
<u>Clostridium septicum</u>	4,0
<u>Eubacterium aerofaciens</u>	2,0
<u>Peptococcus asaccharolyticus</u>	1,0
<u>Peptococcus prevoti</u>	2,0
<u>Peptostreptococcus anaerobius</u>	1,0
<u>Peptostreptococcus intermedius</u>	4,0
<u>Propionibacterium acnes</u>	0,5
<u>Bacteroides fragilis</u> sp. <u>fragilis</u> 111.	64,0
<u>Fusobacterium necrophorum</u>	8,0

15

20

25

30

El dihidrocloruro del antibiótico A-35512 factor B ha presentado actividad antimicrobiana in vivo contra infecciones bacterianas experimentales. Cuando se administraron a ratones dos dosis subcutáneas del A-35512 factor B en infecciones ilustrativas, la actividad observada se midió como un valor DE<sub>50</sub> [dosis efectiva en mg/kg para proteger al 50 % de los animales experimentales; véase Warren Wick y colaborado-

1 res, J. Bacteriol. 81, 233-235 (1961)]. Los valores DE<sub>50</sub> observados para el dihidrocloruro del A-35512 factor B se encuentran en la Tabla XI.

TABLA XI

5

<u>Organismo de ensayo</u>	<u>DE<sub>50</sub></u>	<u>Infección</u>
<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	1,75	260 x DL <sub>50</sub> (ip)
<u>Diplococcus pneumoniae</u> Park I	4,3	60,8 x DL <sub>50</sub> (ip)
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	6,9	206 x DL <sub>50</sub> (ip)

10

El dihidrocloruro del A-35512 factor B también protege a los cobayas que han sido infectados con el anaerobio Clostridium chauvoei (el agente patógeno de la pata negra en el ganado bovino). Estos ensayos se realizaron de acuerdo con el método de ensayo suplementario U.S.D.A. para determinar la potencia de los productos que contienen Clostridium chauvoei (SAM 200, Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa 50010, 7 de Abril de 1975, bajo 9 C.F.R. 113.91). Los resultados de los ensayos se encuentran en la Tabla XII.

15

20

TABLA XII

25

<u>Tratamiento</u>	<u>Ataque Muertes/total</u>	<u>Porcentaje protegido</u>
A-35512 factor B, 10 mg/kg*	0/10	100
A-35512 factor B, 1 mg/kg*	3/10	70
Control atacado	10/10	0

\* Administración intramuscular.

30

Los antibióticos A-35512 son relativamente atóxicos. Por ejemplo, la DL<sub>0</sub> del dihidrocloruro del A-35512 factor A,

1 administrado subcutáneamente a ratones hembra ICR Cox y  
Harlan en ayunas, es superior a 8000 mg/kg. La DL<sub>50</sub> del dihi-  
drocloruro del A-35512 factor B en ratones, cuando se admi-  
nistra por inyección intraperitoneal, es aproximadamente de  
5 1356 mg/kg y, cuando se administra intravenosamente, es  
>1000<1250 mg/kg. El dihidrocloruro del A-35512 factor C y  
el hidrocloreuro del A-35512 factor E presentan una toxicidad  
aguda, cuando se administran intraperitonealmente a ratones.  
superior a 300 mg/kg.

10 Otra propiedad importante de la mezcla A-35512 y de  
sus compuestos es la capacidad de aumentar la eficiencia de  
utilización del pienso en los animales. Esta capacidad ha si-  
do puesta de manifiesto en rumiantes que presentan una función  
desarrollada del rumen.

15 Es sabido que la eficiencia de utilización de los hi-  
dratos de carbono en los rumiantes es aumentada mediante tra-  
tamientos que estimulan la flora del rumen de los animales pa-  
ra producir compuestos propiónicos en lugar de compuestos  
acéticos o butíricos (para una discusión más completa, véase  
20 Church y colaboradores en "Digestive Physiology and Nutrition  
of Ruminants", vol. 2, 1971, págs. 622 y 625).

25 La eficiencia de utilización del pienso puede ser me-  
dida mediante ensayos in vivo en ganado vacuno fistulado,  
utilizando el método descrito por Arthur P. Raun en la paten-  
te estadounidense 3.794.732 (véase especialmente el Ejemplo 8).  
La Tabla XIII compendia los resultados de este ensayo con el  
dihidrocloruro del A-35512 factor B, donde las concentraciones  
de ácido propiónico en el rumen, en porcentaje en moles, son  
el promedio de cinco análisis en un periodo de tratamiento  
30 de 21 días.

TABLA XIII

<u>Tratamiento</u>	<u>Número de animales</u>	<u>Porcentaje molar promedio de ácido propiónico</u>	<u>Aumento del porcentaje molar sobre el control</u>
Control	5	19,3	-
A-35512 factor B, 50 g/Tm	5	26,0	6,7

La mezcla A-35512 y sus compuestos son típicamente eficaces para aumentar los propionatos y, por lo tanto, la eficiencia y utilización del pienso cuando se administran a los rumiantes por vía oral, a dosis comprendidas aproximadamente entre 0,15 y 10,0 mg/kg/día. Se consiguen los máximos resultados beneficiosos a dosis de 1,0 a 2,0 mg/kg/día aproximadamente. Un método preferido de administración de la mezcla A-35512 o de sus compuestos consiste en mezclarla con el pienso de los animales; sin embargo, puede ser administrada por otros métodos, por ejemplo mediante tabletas, purgas, bolos o cápsulas. La formulación de estas diversas formas de dosificación puede realizarse por métodos conocidos en farmacia veterinaria. Cada dosis unitaria individual puede contener una cantidad de mezcla A-35512 o de sus compuestos directamente relacionada con la dosis diaria apropiada para el animal que ha de ser tratado.

La mezcla A-35512 y sus compuestos también son útiles como agentes promotores del crecimiento en los animales. En los ensayos que utilizan pollos de asar, el dihidrocloruro del A-35512 factor B, agregado al pienso a razón de 20 g por tonelada, mejora el aumento de peso y la eficiencia del pienso. La Tabla XIV resume los resultados de estos ensayos en un estudio en batería, utilizando cuatro duplicados de

ocho aves para cada uno de los dos duplicados de tiempo.

TABLA XIV

<u>Trata-</u> <u>miento</u>	<u>Conc.</u> <u>(g/lm)</u>	<u>Aumento de</u> <u>peso (g)</u>	<u>% de mejora so</u> <u>bre el control</u>	<u>Eficiencia</u> <u>del pienso</u>	<u>% de mejora so</u> <u>bre el control</u>
Control	-	380	-	1,850	-
A-35512 factor B	20	394	3,68	1,776	4,00

La Tabla XV contiene los resultados de estos ensayos en un estudio en corral, utilizando doce duplicados de 80 aves cada uno.

TABLA XV

<u>Trata-</u> <u>miento</u>	<u>Conc.</u> <u>(g/lm)</u>	<u>Aumento de</u> <u>peso (g)</u>	<u>% de mejora so</u> <u>bre el control</u>	<u>Eficiencia</u> <u>del pienso</u>	<u>% de mejora so</u> <u>bre el control</u>
Control	-	1898	-	2250	-
A-35512 factor B	20	1956*	3,06	2177*	2,81

\*  $p \leq 0,05$

La mezcla A-35512 y sus compuestos son típicamente eficaces en la promoción del crecimiento del ganado aviar cuando se administran con el pienso de los animales en proporciones que oscilan aproximadamente entre 1 y 100 g de la mezcla A-35512 o de sus compuestos por tonelada de pienso.

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

EJEMPLO 1

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 solución se utiliza para inocular un tubo inclinado de agar extracto de levadura-malta Bacto (ISP n° 2, Difco Laboratories, De-

1 troit, Michigan).

5 El tubo inoculado se incuba a 30°C durante unos 7 días. 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>
10	Caldo de soja tripticasa (Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, Md.)	30 g
15	Agua desionizada, c.s. para	1 litro

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>
25	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
	ZnCl <sub>2</sub>	0,03
30	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1

1	Acido L-glutámico	1,0
	DL-citrulina	0,1
	CaCO <sub>3</sub>	5,0
	Agua desionizada c.s. para	1 litro

5 El medio de producción inoculado se incubaba 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.

10 B. Fermentación en tanque 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.

15 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.

25 EJEMPLO 2

30 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 proce-

1

dimiento:

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:

5

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

10

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.

15

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.

20

### EJEMPLO 3

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

25

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad (g/l)</u>
Dextrina de tapioca	75,0
Melaza	40,0
Peptona soluble de carne	15,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5

30

1

CaCO<sub>3</sub>

2,0

Agua c.s. para

1 litro.

EJEMPLO 4

Separación de la mezcla antibiótica A-35512

5

Se filtra el caldo de fermentación completo (250 galones, 945 litros), obtenido como se ha descrito en el Ejemplo 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 pasa por una columna que contiene 10 ml de un adsorbente polimérico (Amberlite XAD-4, Rohm and Haas Co.) por cada 100 ml de filtrado del caldo, a un caudal de 150 ml por minuto. En las fracciones así obtenidas se determina la actividad biológica utilizando un ensayo en disco habitual frente a Sarcina lutea. El efluente biológicamente inactivo se desprecia. La columna se lava con agua (1/8 del volumen del caldo) a un caudal de 150 ml por minuto. Las aguas de lavado inactivas se desprecian.

10

15

20

La columna se eluye después con una solución acuosa al 50 % de metanol (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.

25

EJEMPLO 5

Separación de los factores de la mezcla antibiótica A-35512

La mezcla antibiótica A-35512 (alrededor de 3000 g disueltos en 15 litros de metanol), obtenida como se ha descrito en el Ejemplo 4, se cromatografía en una columna de poliamida (Woelm, 100 litros). La columna se eluye con agua desioni-

30

1

zada a un caudal de unos 80-120 ml por minuto.

5

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 con Sarcina lutea.

Los 100 primeros litros de eluato se desprecian. Después se modifica el caudal a unos 160-200 ml por minuto y se recogen fracciones de 12 litros. De esta forma se recogen 20 fracciones.

10

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

15

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

20

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:

<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

25

EJEMPLO 6

Purificación del A-35512 factor B

30

Se disuelven 400 g del dihidrocloruro del A-35512 factor B parcialmente purificado, obtenido como se ha descrito

1 en el Ejemplo 5, en 1,2 litros de metanol acuoso al 50 % y se cromatografía en una columna de alúmina preparada como sigue:

5 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. Después se agita la alúmina con metanol acuoso al 50 % y se introduce en una columna con un diámetro de 13,5 cm. La columna de alúmina se lava con metanol acuoso al 10 50 % hasta que se obtiene un efluente transparente.

15 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:

<u>Fracciones</u>	<u>Peso</u>
17-21	9,6 g
20 22-29	72,0 g
30-37	117,0 g

25 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.

EJEMPLO 7

Preparación de A-35512 factor B exento de cloro iónico

30 Un gramo del hidrocloreuro del A-35512 factor B purifica

1 do, obtenido como se ha descrito en el Ejemplo 6 y disuelto  
en 40 ml de agua, se pasa a través de una columna cambiadora  
de ion de 2,5 x 18 cm (Bio-Rad AG3-4x, en el ciclo OH<sup>-</sup>),  
a un caudal de 0,5 ml/minuto, eluyendo con agua desionizada.  
5 Se desprecian los 5 primeros ml de eluato. El eluato siguiente  
(50 ml) se evapora a sequedad a vacío para dar 0,76 g  
del A-35512 factor B exento de cloro iónico en forma de polvo  
blanco que contiene aproximadamente 1.59 % de cloro. Una  
solución de este A-35512 factor B exento de cloro iónico en  
10 dimetilformamida acuosa al 66 % tiene un pH de 9,13.

EJEMPLO 8

Purificación del A-35512 factor A

15 El dihidrocloruro del A-35512 factor A parcialmente purificado  
(1 g), obtenido como se ha descrito en el Ejemplo 5  
(fracciones 1-10), se disuelve en 5 ml de metanol acuoso al  
50 %. Esta solución se cromatografía sobre una columna de  
alúmina ácida de 3 x 16 cm (M. Woelm), preparada como se ha  
descrito en el Ejemplo 5. La columna se eluye con metanol  
acuoso al 50 % a un caudal de 0,5 ml/minuto. Se recogen frac-  
20 ciones con un volumen de 5 ml; todas las fracciones se anali-  
zan por bioautografía en capa fina como se ha descrito en el  
Ejemplo 5. Basándose en estos ensayos, se combinan las frac-  
ciones 7 a 15, se concentran a presión reducida hasta peque-  
ño volumen y se liofilizan para dar 0,3 g del dihidrocloru-  
25 ro del A-35512 factor A (4,71 % de cloro).

EJEMPLO 9

Preparación del A-35512 factor A exento de cloro iónico

30 Se disuelven 200 mg del dihidrocloruro del A-35512 factor  
A, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 8, en  
10 ml de agua; esta solución se pasa por una columna cambia-

1 dora de ion de 1,5 x 10 cm (Bio-Rad AG3-4X, en el ciclo OH<sup>-</sup>)  
a un caudal de 0,5 ml/minuto, eluyendo con agua desionizada.  
El eluato inicial (10 ml) se desprecia. El eluato siguiente  
5 (20 ml) se concentra hasta pequeño volumen a presión reduci-  
da y después se liofiliza para dar 115 mg del A-35512 fac-  
tor A exento de cloro iónico.

EJEMPLO 10

Purificación del A-35512 factor C

10 El dihidrocloruro del A-35512 factor C parcialmente  
purificado (15 g), obtenido como se ha descrito en el Ejem-  
plo 5 (fracciones 25-31), se disuelve en 40 ml de agua des-  
ionizada. Esta solución se aplica a una columna de poliami-  
da de 4 x 115 cm (MN, <0,07 mm, Brinkman Instruments, Inc.;  
15 preparada y lavada durante la noche con agua). La columna se  
eluye con agua desionizada a un caudal de unos 3 ml por mi-  
nuto. El primer efluente (250 ml) se desprecia; a continua-  
ción, se recogen fracciones con un volumen de 24 ml.

20 Las fracciones se exploran por bioautografía cromato-  
gráfica en capa fina. Se utilizan las placas de cromatografía  
en capa fina de celulosa (sobre láminas de aluminio; E. Merck,  
Alemania Occidental); un sistema disolvente de sec-butanol/-  
piridina/ácido acético/agua (10:10:3:8) y Bacillus subtilis  
como organismo detector. Basándose en los resultados de la  
25 cromatografía en capa fina, se combinan las fracciones 1 a  
33, se concentran a vacío hasta un volumen de 150 ml y se  
liofilizan.

30 Se cromatografían dos lotes más de dihidrocloruro de  
A-35512 factor C parcialmente purificado, utilizando las mis-  
mas condiciones. Cada vez se combinan las fracciones 1 a 33,  
se concentran a vacío hasta 150 ml y se liofilizan, Las tres

1 muestras liofilizadas de las tres columnas se combinan para dar 12,3 g del dihidrocloruro del A-35512 factor C parcialmente purificado.

5 Este dihidrocloruro del A-35512 factor C se purifica de nuevo por cromatografía sobre otra columna de poliamida como se ha descrito antes, pero recogiendo fracciones con un volumen de 15 ml, a un caudal de 1 ml por minuto. La columna se explora de nuevo por bioautografía cromatográfica en capa fina. Se combinan las fracciones 36 a 58, se concentran a vacío hasta un volumen de 150 ml y se liofilizan para dar 5,3 g del dihidrocloruro del A-35512 factor C más purificado.

10 La purificación final del dihidrocloruro del A-35512 factor C se realiza por cromatografía en una columna de óxido de aluminio ácido de 5 x 41 cm (Woelm). La columna se rellena y se lava con metanol acuoso al 50 %. Cuando el efluente de lavado es transparente, se aplica a la columna el A-35512 factor C (5,3 g disueltos en 30 ml de metanol acuoso al 50 %). La columna se eluye con metanol acuoso al 50 % a un caudal de 1 ml por minuto. Se recogen fracciones con un volumen de 12 ml y se exploran por bioautografía cromatográfica en capa fina como se ha descrito anteriormente. Se combinan las fracciones 22 a 74, se concentran a vacío hasta un volumen de 250 ml y se liofilizan para dar 3,86 g del dihidrocloruro del A-35512 factor C.

#### EJEMPLO 11

##### Preparación de A-35512 factor C exento de cloro iónico

30 Se cromatografían 200 mg del dihidrocloruro del A-35512 factor C, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 10, sobre una resina cambiadora de ion débilmente básica, utilizan-

1 do el procedimiento dado en el Ejemplo 9, para obtener 156  
mg del A-35512 factor C exento de cloro iónico. Este A-35512  
factor C exento de cloro iónico contenía aproximadamente  
1,90 % de cloro.

5

EJEMPLO 12

Purificación del A-35512 factor E

10

Se disuelven 8,1 g del hidrocioruro del A-35512 fac-  
tor E parcialmente purificado, obtenido como se ha descrito  
en el Ejemplo 5 (fracciones 32-44), en 40 ml de agua desioni-  
zada. Esta solución se aplica a una columna de poliamida  
de 5 x 110 cm (MN,  $\leq 0,07$  mm, Brinkman Instruments, Inc.),  
preparada y lavada con agua durante la noche, La columna se  
eluye con agua desionizada a un caudal de 20 ml cada 15 mi-  
nutos, recogiendo fracciones con un volumen de 20 ml. En la  
15 fracción 118 se cambia el disolvente eluyente a metanol acu-  
so al 50 %. Las fracciones se exploran por bioautografía  
cromatográfica en capa fina como se ha descrito en el Ejem-  
plo 10.

15

20

Las fracciones 148 a 195 contienen el A-35512 factor  
E. Estas fracciones se combinan, se concentran a presión re-  
ducida hasta un volumen de 150 ml y se liofilizan para dar  
2,7 g del hidrocioruro del A-35512 factor E.

25

Se disuelven 615 mg de este hidrocioruro del A-35512  
factor E parcialmente purificado en 5 ml de metanol acuoso  
al 50 % y se aplican a una columna de óxido de aluminio áci-  
do de 1,5 x 50 cm (Woelm) que ha sido preparada y lavada con  
metanol acuoso al 50 %, hasta que el efluente es transparen-  
te. La columna se eluye con metanol acuoso al 50 % a un  
caudal de 1 ml por minuto, recogiendo fracciones con un volu-  
men de 10 ml. De nuevo las fracciones se exploran por bioauto

30

1 grafía cromatográfica en capa fina. Se combinan las fraccio-  
nes 5 a 8 y se concentran a presión reducida hasta un volu-  
men de unos 10 ml. Se añaden unos 50 ml de agua desionizada  
5 y la solución resultante se liofiliza para dar 480 mg del  
hidrocloruro del A-35512 factor E.

EJEMPLO 13

Preparación del A-35512 factor E exento de cloro iónico

10 Se cromatografían 200 mg del hidrocloruro del A-35512  
factor E, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 12,  
sobre una resina cambiadora de ion débilmente básica, utili-  
zando el procedimiento dado en el Ejemplo 9, para obtener  
170 mg de A-35512 factor E exento de cloro iónico. Este  
A-35512 factor E exento de cloro iónico contenía aproxima-  
damente 1,72 % de cloro.

EJEMPLO 14

Purificación del A-35512 factor H

15 Se disuelven 30 g del hidrocloruro del A-35512 factor  
H parcialmente purificado, obtenido como se ha descrito en  
el Ejemplo 5 (fracciones 1-10), en una cantidad mínima de so-  
lución de metanol/agua (7:3). La solución resultante se adsor-  
20 be en una columna de óxido de aluminio ácido (3 x 60 cm;  
Woelm; rellena en metanol y eluida con metanol hasta que el  
efluente es transparente). Después la columna se eluye con  
metanol a un caudal de 4 ml/minuto. Se recogen las fracciones  
25 con un volumen de 24 ml. El disolvente eluyente se cambia en  
la fracción 59 a metanol/agua 1:1.

30 Las fracciones se exploran por cromatografía en capa  
fina utilizando un sistema disolvente de cloroformo/metanol/-  
hidróxido amónico (2:3:1) y bioautografía con Bacillus  
subtilis a pH alcalino.

1           Se combinan las fracciones 51 a 118 y se evaporan a vacío para dar 6,4 g del hidrocioruro del A-35512 factor H purificado.

EJEMPLO 15

5           Preparación del A-35512 factor H exento de cloro iónico

10           Se cromatografían 200 mg del hidrocioruro del A-35512 factor H, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 14, sobre una resina cambiadora de ion débilmente básica, utilizando el procedimiento indicado en el Ejemplo 9, para dar 143 mg de A-35512 factor H exento de cloro iónico. Este A-35512 factor H exento de cloro iónico contenía aproximadamente 1,59 % de cloro.

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

15           REIVINDICACIONES

          1. Un procedimiento para la producción de la mezcla antibiótica A-35512 que comprende los factores A, B, C, E, F, G y H, A-35512 factor A, A-35512 factor B, A-35512 factor C, A-35512 factor E, A-35512 factor F, A-35512 factor G y A-35512 factor H, cuyo procedimiento se caracteriza por:

- 20           a) cultivar Streptomyces candidus NRRL 8156 o un mutante del mismo productor de A-35512 en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones de fermentación aerobia sumergida, hasta que se ha producido una cantidad sustancial de actividad antibiótica;
- 25           b) opcionalmente, separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cultivo;
- c) opcionalmente, aislar de la mezcla antibiótica A-35512 los factores A, B, C, E, F, G y H del antibiótico A-35512.

 30

1                    2. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la  
producción de la mezcla antibiótica A-35512, caracterizado  
por:

- 5
- a) cultivar Streptomyces candidus NRRL 8156 o un mutante del mismo productor de A-35512 en un medio de cultivo;
  - b) separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cultivo y
  - c) aislar de la mezcla antibiótica A-35512 los factores A, B, C, E, F, G y H del antibiótico A-35512.

10                    3. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para  
la preparación del antibiótico A-35512 factor A, caracte-  
rizado por:

- 15
- a) cultivar Streptomyces candidus NRRL 8156 o un mutante del mismo productor de A-35512 en un medio de cultivo;
  - b) separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cultivo y
  - c) aislar de la mezcla antibiótica A-35512 el antibiótico A-35512 factor A.

20                    4. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la  
preparación del antibiótico 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;
  - b) separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cultivo y
  - c) aislar de la mezcla antibiótica A-35512 el antibiótico A-35512 factor B.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la  
preparación del antibiótico A-35512 factor C, caracteriza-  
do por:

~~30~~

- 1
- a) cultivar Streptomyces candidus NRRL 8156 o un mutante del mismo productor de A-35512 en un medio de cultivo;
- b) separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cultivo y
- 5
- c) aislar de la mezcla antibiótica A-35512 el antibiótico A-35512 factor C.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la preparación del antibiótico A-35512 factor E, caracterizado por:

- 10
- a) cultivar Streptomyces candidus NRRL 8156 o un mutante del mismo productor de A-35512 en un medio de cultivo;
- b) separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cultivo y
- 15
- c) aislar el antibiótico A-35512 factor E de la mezcla antibiótica A-35512.

7. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la preparación del antibiótico A-35512 factor F, caracterizado por:

- 20
- a) cultivar Streptomyces candidus NRRL 8156 o un mutante del mismo productor de A-35512 en un medio de cultivo;
- b) separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cultivo y
- 25
- c) aislar el antibiótico A-35512 factor F de la mezcla antibiótica A-35512.

8. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la preparación del antibiótico A-35512 factor G, caracterizado por:

- a) cultivar Streptomyces candidus NRRL 8156 o un mutante del mismo productor de A-35512 en un medio de cultivo;
- b) separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cul-

~~30~~

1 tivo y

c) aislar el antibiótico A-35512 factor G de la mezcla anti-  
biótica A-35512.

5 9. Un procedimiento según la Reivindicación 1 para la  
preparación del antibiótico A-35512 factor H, caracteriza-  
do por:-

a) cultivar Streptomyces candidus, NRRL 8156 o un mutante del  
mismo productor de A-35512 en un medio de cultivo;

10 b) separar la mezcla antibiótica A-35512 del medio de cul-  
tivo y

c) aislar el antibiótico A-35512 factor H de la mezcla anti-  
biótica A-35512.

15 10. Se reivindica por último como objeto sobre el que  
ha de recaer la patente de invención que se solicita: UN -  
PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE LA MEZCLA ANTIBIOTICA  
A-35512.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la -  
presente memoria descriptiva que consta de sesenta páginas  
mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

Madrid, 23 de Mayo de 1.977

BERNARDO UNGRIA

p.p.



25

~~30~~

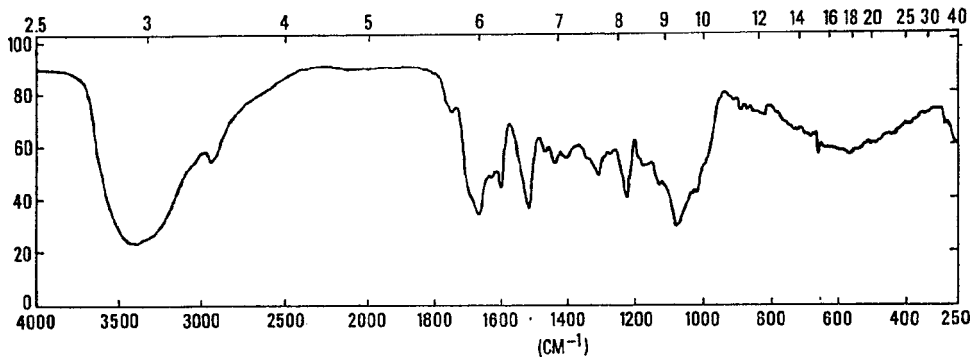


FIG. 1

ESCALA VARIABLE  
Madrid, 23 de Mayo de 1.977  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.

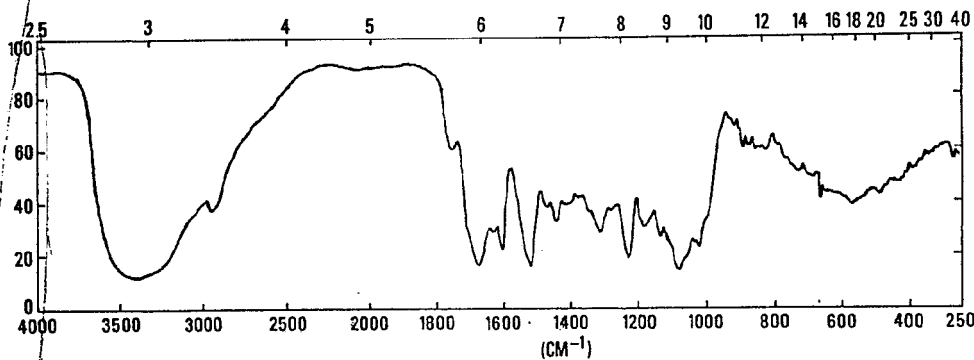


FIG. 2

ESCALA VARIABLE  
Madrid, 23 de Mayo de 1.977  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.

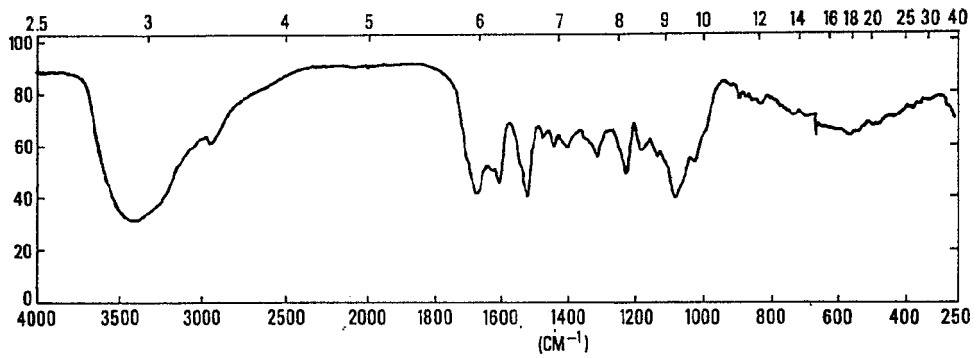


FIG. 3

ESCALA VARIABLE  
Madrid, 23 de Mayo de 1.977  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.

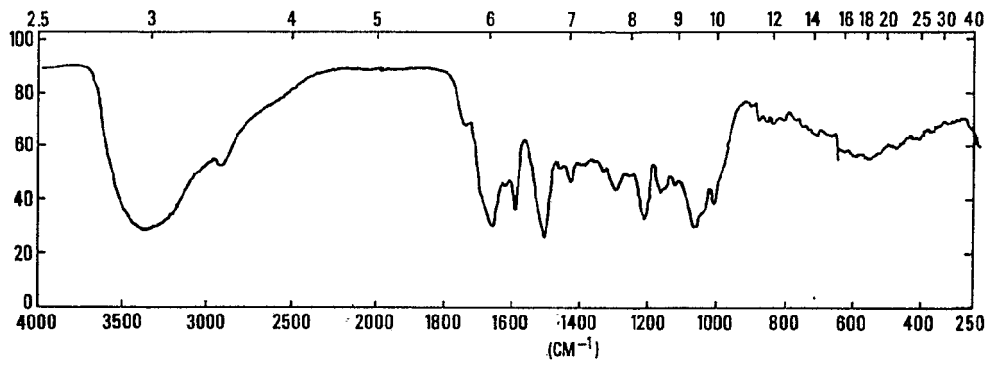


FIG. 4

ESCALA VARIABLE  
Madrid, 23 de Mayo de 1.977  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.

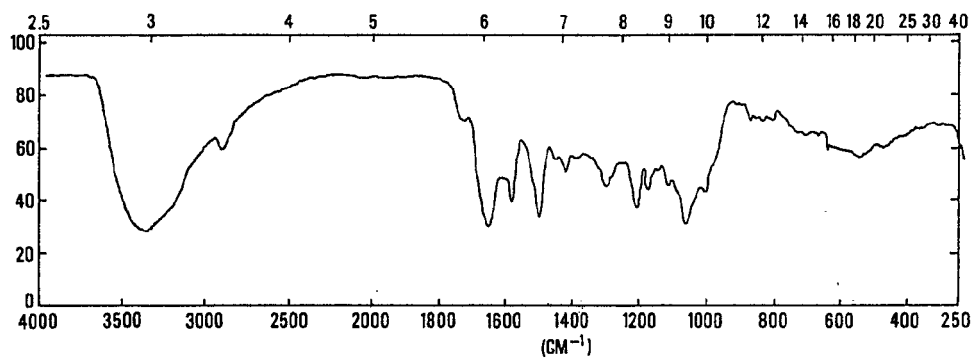


FIG. 5

ESCALA VARIABLE  
Madrid, 23 de Mayo de 1.977  
BERNARDO UNGRIA  
D.P.