

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO	10 A1
	21 459,663	
	22 FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
Showa 51-68306	10 de junio de 1.976	Japón
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D, A61K	
54 TITULO DE LA INVENCION		
PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ANTIBIOTICOS DEPSIPEPTIDOS DE NEOVIRIDOGRISEINAS I, II y III.		
71 SOLICITANTE (S)		
PANLABS Inc., y SANRAKU-OCEAN CO., LTD.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
P.oo. Box 81, FAYETTEVILLE, New York 13066, EE.UU. de A. y Ajinomoto Building, 7-Takara-cho 1-chome, Chuo-ku, Tokyo 104, Japón.		
72 INVENTOR (ES)		
YASUSHI OKUMARA; KAZUHIKO OKAMURA, YASUO FUKAGAWA, TOMOYUKI ISHIKURA KAGEAKI KOUNO y JOSEPH LEIN.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
GOMEZ-ACEBO.		

POOR
QUALITY

Esta invención se relaciona con un procedimiento para la producción y aislamiento de nuevos antibióticos depsipéptidos, denominados neoviridogriseinas I, II y III, útiles como drogas terapéuticas y como aditivos alimenticios para animales.

5

Los denominados antibióticos de la familia micamicina-vernamicina (o estreptogramina) se clasifican en dos grupos principales. Uno de los grupos (grupo A según D. Vazquez; pp 521-534, ANTIBIOTICS III, Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1975) es un compuesto de lactona macrocíclico e incluye griseoviridina, ostreogricina A(=micamicina A=virginiamicina M=estafilomicina M=pristinamicina IIA=vernamicina A=estreptogramina A=sinergistina A-1=Compuesto PA-114A1=Compuesto E-129 Factor A, etc.), ostreogricina G (=virginiamicina MII=estafilomicina MII=pristinamicina IIB=dihidroestreogricina A=Compuesto E-129 Factor B=Compuesto R.P.-13920, etc.), y Compuestos A-2315 A, B y C. Aunque son bacterioestáticos, este grupo de antibióticos son activos contra bacterias Gram-positivas y microplasma.

10

15

20

La griseoviridina, que es uno de los productos de fermentación de esta invención, se produce, como se conoce, junto con viridogriseina mediante estreptomycetos, describiéndose la producción de griseoviridina en las Patentes USA Nos. 3.023.204 y 3.174.902.

25

El otro grupo principal (Grupo B según D. Vazquez) es un compuesto depsipeptido macrocíclico y se divide en dos subgrupos, es decir el subgrupo de viridogriseinas y el subgrupo de vernamicina B. Los antibióticos de este grupo principal son eficaces notablemente para suprimir el crecimen-

30

to de bacterias gram-positivas tales como Staphylococcus aureus y Bacillus subtilis. El subgrupo de vernamicina B contiene 12 homólogos. Debido a que la relación sinónima entre los nombres publicados de antibióticos en este grupo es demasiado complicada, prácticamente es imposible enumerar todos los nombres comunes de este subgrupo. Algunos compuestos representativos, y científicamente importantes, de este subgrupo, son los siguientes:

1. Vernamicina B α =ostrogricina B=pristinamicina IA=micanicina B=estreptogramina B=sinergistina B-1=compuesto E-129 Factor Z=compuesto PA114B1.
2. Vernamicina B γ =ostreogricina B1=pristinamicina IC=compuesto E-129 Factor Z1
3. Vernamicina B β =ostreogricina B2=pristinamicina IB=compuesto E-129 Factor Z2=compuesto R.P. -13919
4. Ostreogricina B3=compuesto E-129 Factor Z3.
5. Patricina A
6. Patricina B
7. Vernamicina B δ
8. Vernamicina C=doricina
9. Virginiamicina (estafilomicina)S
10. Virginiamicina (estafilomicina)S2
11. Virginiamicina (estafilomicina)S3
12. Virginiamicina (estafilomicina)S4 (ó S1)

Los compuestos de este subgrupo tienen la característica común de que están compuestos de siete constituyentes que participan en los mismos cuatro constituyentes de ácido 3-hidroxicicolínico, L-treonina, L-prolina y L-fenilglicina. Por otro lado, en el subgrupo de viridogriseinas solamente se conoce uno de los compuestos, viridogriseina, y está bien

establecida la identidad con viridogriseina de etamicina, compuesto K-179 y compuesto F-1370A. En contraste al anterior subgrupo de vernamicina B, la viridogriseina está compuesta de ocho constituyentes, es decir ácido 3-hidroxipicolínico, L-treonina, D-leucina, 4-hidroxi-D-prolina, sarcosina, β ,N-dimetil-L-leucina, L-alanina y L-fenilsarcosina. Como es evidente en la siguiente descripción detallada de la invención, los antibióticos de neoviridogriseina de esta invención pertenecen a este subgrupo de viridogriseinas y uno de los compuestos, neoviridogriseina IV, ha sido identificado como viridogriseina. La preparación de viridogriseina se describe en la Patente USA No. 3.023.204.

El sinergismo entre el grupo A y el grupo B es bien conocido sobre varios microorganismos y utilizado ventajosamente para potenciar la eficacia terapéutica de drogas farmacéuticas que contienen al antibiótico de esta familia como componente activo. Esto también es cierto para las neoviridogriseinas.

Esta invención se relaciona con un procedimiento para preparar nuevas y útiles sustancias antibióticas depsipéptidas. Más particularmente, se relaciona con la producción de un grupo de antibióticos depsipéptidos denominados neoviridogriseinas I, II y III y viridogriseina. Estos antibióticos son activos contra bacterias gram-positivas y micoplasmas y pueden emplearse en formas diluídas, como concentrados en bruto, o en forma pura, con o sin griseoviridina.

Constituye un objeto de la presente invención proporcionar un grupo de nuevos antibióticos depsipéptidos denominados neoviridogriseinas I, II y III, que son altamente eficaces a la hora de inhibir el crecimiento de varias bac-

terias gram-positivas y micoplasmas.

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de estos antibióticos depsi-
péptidos, mediante fermentación de un medio acuoso adecuado
5 bajo condiciones aeróbicas por una nueva especie de
Streptomyces denominada Streptomyces sp. P8648 (FERM-P3562),
con lo cual las neoviridogriseinas formadas recuperan del
caldo de fermentación con o sin griseoviridina.

Igualmente, constituye otro objeto de la presente
10 invención proporcionar un método para la producción selectiva
del componente o componentes deseados de neoviridogriseina
suministrando algún aminoácido o aminoácidos pertinentes,
más particularmente, prolina, para aumentar neoviridogriseinas
I y II, y ácido alfa-amino-n-butírico para aumentar neovirido-
15 griseinas I y III, durante o antes de la fermentación. Otros
objetos serán evidentes a partir de la descripción detallada
de la invención. Las neoviridogriseinas I, II y III de la
presente invención son valiosos antibióticos que resultan
altamente activos contra varios microorganismos patogénicos
20 incluyendo bacterias gram-positivas y micoplasmas y, en con-
secuencia, encuentran utilidad en medicina humana y veterina-
ria. Más específicamente, los antibióticos de esta invención
se pueden utilizar como drogas terapéuticas para el tratamiento
de enfermedades infecciosas causadas por bacterias gram-positi-
25 vas y microplasma, por ejemplo, Staphilococcus aureus,
Streptococcus pyogenes, Diplococcus pneumoniae, Mycoplasma
gallisepticum, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma agalactiae,
etc.

En esta invención, el término sin modificar "neo-
30 viridogriseina" se emplea para designar genericamente antibió-

5 ticos depsipéptidos denominados neoviridogriseinas; es decir, no solo significa un miembro del grupo de neoviridogriseinas I, II y III y viridogriseina (=neoviridogriseina IV), sino también una mezcla de dos o más de los miembros seleccionados de dicho grupo.

Microorganismos

10 Los nuevos antibióticos depsipéptidos de la invención se producen mediante una nueva cepa de Streptomyces denominada Streptomyces sp. P8648 (FERM-P 3562) junto con viridogriseina y griseoviridina. Este microorganismo ha sido aislado de una muestra de tierra recogida cerca de la presa Kuzuryu en Fukui-ken, Japón.

15 En términos generales, el microorganismo de esta invención se deriva de micelio aéreo corto, incoloro, de micelios sustrato bien ramificados (una sola ramificación). Sobre la parte superior del micelio aéreo se forman cadenas de esporas con superficie lisa según un bucle suelto. No se observan remolinos ni ascosporas. Las características de cultivo de estos microorganismos sobre varios medios de agar, son las siguientes:

(1) Agar de sucrosa-nitrato

Crecimiento : Pobre
Micelio aéreo : Micelio aéreo blanco, delgado, ocasionalmente formado
Invertido : Incoloro a blanco grisáceo

25 Pigmento soluble : Nada.

(2) Agar de glucosa-asparagina

Crecimiento : Abundante.
Micelio aéreo : Poco o nada. Cuando se forma, blanco
Invertido : Blanco amarillento pálido a amarillo claro.

	Pigmento soluble	: Nada.
	(3) Agar de glicerina-asparagina	
	Crecimiento	: Moderado
	Micelio aéreo	: Poco o nada. Cuando se forma, blanco.
5	Invertido	: Amarillo pálido a amarillo grisáceo.
	Pigmento soluble	: Nada.
	(4) Agar de extracto de levadura-extracto de malta	
	Crecimiento	: Abundante
	Micelio aéreo	Blanco a blanco con matiz grisáceo
10	Invertido	: Amarillo claro, virando luego a gris parduzco.
	Pigmento soluble	: Nada o raramente marrón claro.
	(5) Agar de almidón	
	Crecimiento	: Moderado
	Micelio aéreo	: Nada o poco. Cuando se forma, blanco
15	Invertido	: Amarillo pálido con color canela grisáceo claro en el centro de las colonias
	Pigmento soluble	: Nada
	Hidrólisis de almidón	: Pobre
	(6) Agar de tirosina	
	Crecimiento	: Moderado
20	Micelio aéreo	: Nada o unas cuantas manchas de micelio aéreo blanco ocasionalmente observado
	Invertido	: Amarillo grisáceo a canela amarillento claro
	Pigmento soluble	: Inicialmente púrpura pálido a marrón rojizo claro, virando 10 días después a marrón pálido. Poca formación de pigmento melanoide.

(7) Agar nutriente

- Crecimiento : Bueno
Micelio aéreo : Delgado, blanco
Invertido : Amarillo pálido
5 Pigmento soluble : Nada

(8) Agar de harina de avena

- Crecimiento : Bueno
Micelio aéreo : Blanco o blanco grisáceo.
Invertido : Amarillo grisáceo a marrón rojizo
claro con matiz grisáceo
10 Pigmento soluble : Nada.

La temperatura óptima de crecimiento para el microorganismo de esta invención es del orden de 25 a 35°C. Aunque el crecimiento es muy pobre, el microbio puede crecer incluso a una temperatura más allá de la citada gama de temperatura, como 10 o 45°C. Sin embargo, no puede crecer a una temperatura de 52°C.

Este actinomiceto licua gelatina en un medio de glucosa-peptona-gelatina; hidroliza suavemente al almidón en agar de almidón-sales inorgánicas; y peptoniza la leche desnatada sin coagulación.

Se observa ocasionalmente la producción de pigmento melanoide en agar de tirosina, pero no en agar de peptona-extracto de levadura-hierro y caldo de tirosina-extracto de levadura.

El modelo de asimilación de fuente de carbono de este microorganismo es el siguiente (en medio de Pridham-Gottlieb):

- Positivo : D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa,
L-ramnosa, D-manitol
30 Ligeramente positivo : Sucrosa
Negativo : L-arabinosa, i-inositol, rafinosa.

En relación con la producción de antibióticos macrólidos de péptidos y no péptidos conocidos, del tipo de las micamicinas A y B, virginiamicinas, ostreogricinas, etamicina, vernamicinas, viridogriseina, griseoviridina y pristinamicinas, deben compararse los siguientes microorganismos con Streptomyces sp. P8648:

Streptomyces griseus NRRL 2426

griseoviridus NRRL 2427

sp., productos de etamicina

conganensis

ostreogriseus

mitakaensis

loidensis

La información disponible sobre las características de cultivo y fisiológicas de dichos microorganismos, muestra claras diferencias entre el streptomiceto reivindicado en esta invención y los antes mencionados. Por ejemplo, Streptomyces griseus NRRL 2426 difiere en que pertenece a la sección rectiflexible con cadenas de esporas rectas o ligeramente onduladas, mientras que el microorganismo de esta invención está incluido en la sección de espirales; el primero produce micelio aéreo de color gris a gris amarillento sobre agar de extracto de levadura-extracto de malta, mientras que los últimos producen micelio aéreo de color blanco a blanco grisáceo; y el primero utiliza L-arabinosa mientras que los últimos no lo hacen. Streptomyces sp., productor de etamicina que ha sido especificado en Antibiotics Annual 1954-1955, pp. 728-732, se puede diferenciar del microorganismo de esta invención en cuanto al modelo de asimilación de fuentes carbonadas y características de cultivo sobre agar Czapek, agar de glucosa-asparagina y agar nutriente. Streptomyces conganensis muestra claras diferencias en las características morfológicas

de esporas. Entre los microorganismos anteriormente indicados, el Streptomyces griseoviridus NRRL 2427 parece ser el más similar a los estreptomicetos de esta invención. Los resultados de la comparación taxonómica entre los dos tipos de cultivo, se resumen en la siguiente tabla:

	<u>Streptomyces</u> <u>griseoviridus</u> NRRL 2427	<u>Streptomyces</u> sp. P 8648
Color del micelio aéreo	Amarillo anaranjado pálido a rosa amarillento con matiz gris sobre agar de extracto de levadura-extracto de malta, agar de harina de avena, agar de almidón y agar de glicerina-asparagina.	Blanco a blanco grisáceo, micelio aéreo pobremente formado sobre la mayoría de los medios ISP. Micelio aéreo blanco formado abundantemente sobre agar de extracto de levadura-extracto de malta.
Color del micelio sustrato	Amarillo grisáceo a marrón oliva o marrón negruzco sobre agar de extracto de levadura-extracto de malta, agar de harina de avena, agar de almidón y agar de glicerina-asparagina.	Amarillo pálido o amarillo claro a marrón grisáceo sobre la mayoría de los medios ISP.
Pigmento soluble	Sin formación de pigmento melanoide. Ningún otro pigmento normalmente observado, pero raramente se forma pobremente pigmento amarillo.	Sin formación de pigmento melanoide. Ningún otro pigmento normalmente observado, pero raramente se forma ligeramente pigmento marrón.
Utilización de fuentes carbonadas	L-arabinosa +++ D-fructosa ± Sucrosa -	L-arabinosa - D-fructosa +++ Sucrosa ±

Como será evidente a partir de la tabla anterior, se han confirmado claras diferencias entre Streptomyces griseoviridus NRRL 2427 y el estreptomiceto de esta invención en cuanto a características morfológicas y de cultivo y en
5 cuanto al modelo de utilización de fuentes carbonadas. En adición, cuando ambos microorganismos se fermentan bajo condiciones idénticas, el microorganismo de esta invención puede producir neoviridogriseinas I, II y III así como viridogriseina (neoviridogriseina IV) y griseoviridina, mientras que el cul-
10 tivo de Streptomyces griseoviridus NRRL 2427 produce solamente viridogriseina y griseoviridina, pero no neoviridogriseinas I, II y III.

A partir de los resultados anteriormente descritos, el microorganismo empleado en esta invención ha llegado a
15 constituir una nueva especie de Streptomyces denominada Streptomyces sp. P8648. El cultivo de este microorganismo ha sido depositado en Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, con el número FERM-P No. 3562.

20 Los expertos en la técnica podrán comprender que esta invención no se limita al microorganismo particular que anteriormente se ha especificado y que ha sido presentado como FERM-P No. 3562 en Fermentation Research Institute, sino que incluye a todos aquellos mutantes espontáneos y artifi-
25 ciales derivados del citado microorganismo que son capaces de producir los nuevos antibióticos, neoviridogriseina I, II y III.

Producción de neoviridogriseinas I, II y III

30 En términos generales, los nuevos antibióticos de esta invención se producen por inoculación y propagación

de Streptomyces sp. P8648 en un medio adecuado, bajo condiciones aeróbicas, a una temperatura de 18 a 37°C, durante un periodo de 2 a 14 días, con lo cual se recuperan los antibióticos acumulados del caldo de fermentación y se purifica por métodos convencionales. Las formas de realización preferidas del proceso según esta invención, se ilustrarán detalladamente a continuación:

Para la fermentación del microorganismo de esta invención, pueden emplearse todos los tipos de medios que son bien conocidos como medios para Streptomyces. Por ejemplo, fuentes de carbono preferibles del medio son glucosa, glicerina, almidón, dextrina, harina de avena, molasas, grasa y aceite y similares. Como fuente nitrogenada adecuada para los fines de esta invención, se indican harina de soja, harina de algodón, extracto de carne, peptona, levadura seca, licor de maceración de maíz, extracto de levadura, caseína y sus hidrolisatos y sales inorgánicas tales como sulfato amónico y nitrato amónico. Si se desea, se pueden añadir al medio factores menores de crecimiento. Los mismos incluyen vitaminas, aminoácidos, sales orgánicas e inorgánicas tales como carbonato cálcico, cloruro sódico, cloruro potásico, fosfato sódico, fosfato potásico y sulfato de magnesio.

Los nuevos antibióticos de esta invención se pueden producir por fermentación en recipientes tradicionales tales como un matrás sacudido, un fermentador tipo jarra y un fermentador tipo tanque pero, desde un punto de vista económico, es más ventajoso, a escala industrial, el emplear el cultivo sumergido bajo aireación forzada.

La fermentación se efectúa convenientemente bajo condiciones aeróbicas a una temperatura de 25 a 35°C. Cuando

se utiliza un matr az sacudido o un fermentador de tanque, la producción de neoviridogriseinas alcanza un máximo normalmente en 2-10 días. El pH durante la fermentación puede cambiar más allá de la gama fisiológica, en función del tipo de medio empleado. Es más conveniente ajustar y mantener el pH durante la fermentación en la gama de 6-9. Normalmente, el pH del medio se ajusta a 6,5-8,5 antes de la inoculación.

Control de los componentes de neoviridogriseina en el caldo de fermentación

Como antes se ha descrito, el microorganismo de esta invención produce una mezcla de neoviridogriseinas J, II, III y IV y griseoviridina. Es posible cambiar la composición de neoviridogriseina en el caldo de fermentación mediante una combinación adecuada de fuentes carbonadas y nitrogenadas en el medio sin la adición específica de un aminoácido libre o de un ácido orgánico. Sin embargo, será más conveniente, desde el punto de vista de una producción industrial, ajustar el contenido en neoviridogriseinas I, II y/o III en el caldo de fermentación, por adición al medio del constituyente o constituyentes aminoácidos pertinentes en forma libre durante la fermentación, en función de las circunstancias y de la demanda. Todo ello sin decir que la composición de neoviridogriseinas en el caldo de fermentación puede variarse de forma adecuada por selección de mutantes espontáneos o artificiales derivados del cultivo del estreptomiceto de esta invención; ajustando las condiciones de fermentación tales como temperatura, pH y aireación; y/o añadiendo al medio agentes fisiologicamente activos tales como inhibidores y promotores de enzimas. Una de las formas de realización preferidas del método para la producción selectiva de componentes particulares de neoviridogrise-

seína, consiste en alimentar el constituyente o constituyentes aminoácidos pertinentes, ácido alfa-amino-n-butírico y/o prolina durante la fermentación. Más particularmente, la adición de prolina durante la fermentación aumenta el porcentaje de neoviridogriseínas I y II en la cantidad total de neoviridogriseínas I, II, III y IV, las cuales son más potentes en cuanto a la actividad antimicrobial que las neoviridogriseínas III y IV. Igualmente, ésto se cumple también en el caso de alfa-amino-n-butírico. La cantidad de neoviridogriseínas I y III se puede aumentar selectivamente alimentando ácido alfa-amino-n-butírico al medio antes de la inoculación o durante la fermentación. Puesto que el microorganismo de esta invención produce proteasa durante el crecimiento, se puede añadir material proteínico que contiene al constituyente o constituyentes aminoácidos pertinentes en lugar del aminoácido o aminoácidos libres. Por ejemplo, la prolina puede ser sustituida por caseína o por los correspondientes hidrolisatos de hidrólisis ácida tales como, por ejemplo, casamino-ácidos.

Aislamiento y purificación

Los nuevos antibióticos, neoviridogriseínas I, II y III y viridogriseína, se pueden aislar del caldo de fermentación por métodos convencionales, basados en sus propiedades físico-químicas como antibióticos depsipéptidos. Si es necesario, las neoviridogriseínas se pueden recuperar del caldo de fermentación con griseoviridina como una mezcla de neoviridogriseínas-griseoviridina. Cuando se preparan para aditivos alimenticios o para utilizarse como droga veterinaria, será más ventajoso el empleo, desde un punto de vista económico, de una mezcla de neoviridogriseínas y griseoviridina.

Las neoviridogriseínas y la griseoviridina del

caldo de fermentación pueden extractarse con un disolvente orgánico inmiscible en agua. Por ejemplo, resultan adecuados acetato de etilo, acetato de butilo, n-butanol, cloruro de metileno, cloroformo y similares, para la extracción de
5 neoviridogriseinas y griseoviridina de un solo golpe. Cuando resulta más conveniente extraer selectivamente neoviridogriseinas sin griseoviridina, los disolventes orgánicos preferidos son metilisobutilcetona, benceno, tolueno y otros hidrocarburos aromáticos. Puesto que el micelio no contiene prácticamente
10 neoviridogriseinas y el lípido extractable de las células puede interferir frecuentemente con la ulterior etapa de purificación, es más ventajoso extraer dichos antibióticos con un disolvente orgánico del caldo filtrado o caldo centrifugado junto con el agua de lavado.

15 El extracto disolvente de neoviridogriseinas y/o griseoviridina puede aislarse y purificarse adicionalmente de distintas formas. Por ejemplo, se pueden combinar convenientemente para el aislamiento y purificación, los procesos de adsorción y elución con carbón activo, Amberlite XAD-4 y 7
20 (Rohm & Haas Co.), resinas intercambiadoras de iones tales como Amberlite IR-120 (Rohm and Haas Co.) y Dowex 50W-X2 (The Dow Chemical Co.); filtración de gel con Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals AB) y sus equivalentes; cromatografía de adsorción sobre alúmina y gel de sílice, etc. En adición,
25 se puede emplear también, para dichas finalidades, la distribución en contracorriente con un sistema disolvente adecuado.

Propiedades físico-químicas de neoviridogriseinas I, II y III

30 Las neoviridogriseinas I, II y III así como la viridogriseina son sólidos blancos amorfos, solubles en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, dioxano, acetato de etilo, acetato de butilo, acetona, metiletilcetona,

Viridogriseina : 340 nm (96)

Los espectros de absorción infrarroja de neoviridogriseinas I, II, III y viridogriseina, en una tableta de KBr, se muestran en las figuras 9 a 12 respectivamente.

5 Las crestas y hombros característicos se observan en los siguientes números de onda:

Neoviridogriseina I (tableta KBr)

3370, 2910, 2850, 1735, 1670 (hombro), 1635, 1590(hombro),
1515, 1460 (hombro) 1445, 1405, 1375, 1290, 1280, 1250 (hombro),
10 1200, 1190, 1160, 1125, 1100, y 1080 cm^{-1}

Neoviridogriseina II (tableta KBr)

3320, 2950, 2920, 2820, 2800, 1745, 1670 (hombro), 1630,
1600 (hombro), 1575, 1515, 1460 (hombro), 1445, 1405, 1390,
1365, 1330 (hombro), 1295, 1275, 1240, 1200, 1195, 1160, 1130,
15 1095, y 1065 cm^{-1} .

Neoviridogriseina III (tableta KBr)

3335, 2960, 2940, 2870, 1750, 1670 (hombro), 1660 (hombro),
1635, 1590 (hombro), 1515, 1450, 1405, 1390 (hombro), 1370,
1340 (hombro), 1300, 1245, 1200, 1160 (hombro), 1130, 1100 y
20 1065 cm^{-1} .

En los sistemas de cromatografía de capa delgada indicados a continuación, las neoviridogriseinas I, II y III, viridogriseina y griseoviridina, tienen los siguientes valores Rf:

25 (1) Placa TLC : Placa TLC prarrevestida SILICA GEL 60F-254,
E. Merck, Darmstadt.

Disolvente : Benceno:metanol = 5:1

Neoviridogriseina I Rf = 0,66.

II 0,62.

30 Neoviridogriseina III Rf = 0,59.

	Viridogriseina	0,55
	Griseoviridina	0,20
	(2) Placa TLC	: como en (1)
	Disolvente	: Cloroformo:metanol=30:1
5	Neoviridogriseina I	Rf = 0,39
	II	0,32
	III	0,19
	Viridogriseina	0,18
	Griseoviridina	0,02

10 Para el análisis de los constituyentes aminoácidos, cada neoviridogriseina componente se hidroliza en ácido clorhídrico 6N durante la noche a 110°C y el hidrolisato resultante se evapora hasta sequedad. Después de que se evapora repetidamente, hasta incluso una traza del ácido clorhídrico,

15 los aminoácidos del hidrolisato se determinan por cromatografía de capa delgada (lámina Eastman Chromagram 13254 de celulosa con indicador fluorescente, Eastman Kodak Co.; sistema disolvente: n-butanol/ácido acético/agua = 4/1/1), electrofóresis de papel de alta tensión (Papel de filtro Toyo No. 51A,

20 Toyo Roshi Kaisha, Ltd.; sistema tampón: ácido fórmico/ácido acético/agua = 25/75/900, pH = 1,8; 60V/cm a 0°C durante 30 minutos) y autoanálisis de aminoácidos (autoanalizador de aminoácidos (Hitachi KLA-5, Hitachi, Ltd.)). Se confirma la presencia de los siguientes aminoácidos:

- 25 Neoviridogriseina I : treonina
 leucina
 prolina
 ácido alfa-amino-n-butírico
 sarcosina
- 30 fenilsarcosina
 beta,N-dimetil-leucina

5 Neoviridogriseina II: treonina
leucina
prolina
alanina
sarcosina
fenilsarcosina
beta,N-dimetil-leucina

10 Neoviridogriseina III: treonina
leucina
hidroxiprolina
ácido alfa-amino-n-butírico
sarcosina
fenilsarcosina
beta,N-dimetil-leucina

15 Viridogriseina : treonina
leucina
hidroxiprolina
alanina
sarcosina
20 fenilsarcosina
beta,N-dimetil-leucina

La presencia de ácido 3-hidroxi-picolínico se confirma por espectrometría de masa y cromatografía de capa delgada como sigue:

25 Una muestra auténtica de viridogriseina y de cada una de las neoviridogriseinas I, II, III y IV, se hidroliza durante la noche en ácido clorhídrico 6N a 110°C, para dar los hidrolisatos anteriormente descritos. Cada hidrolisato muestra solamente una mancha de absorción ultravioleta con el
30 mismo valor Rf bajo las condiciones indicadas.

(1) TLC gel de sílice

Placa TLC : Placa TLC pre-revestida SILICA GEL 60 F-254,
E. Merck, Darmstadt.

Disolvente : Cloroformo:metanol=2:1

5 Rf : 0,46

(2) TLC celulosa

Placa TLC : Hoja Eastman Chromagram 13254 celulosa con indica-
dor fluorescente, Eastman Kodak Co.

Disolvente : n-butanol:ácido acético:agua = 4:1:1

10 Rf : 0,62

El peso molecular de estos antibióticos se
determina por inserción directa en un espectrómetro de masa.

Neoviridogriseina I : 876

II : 862

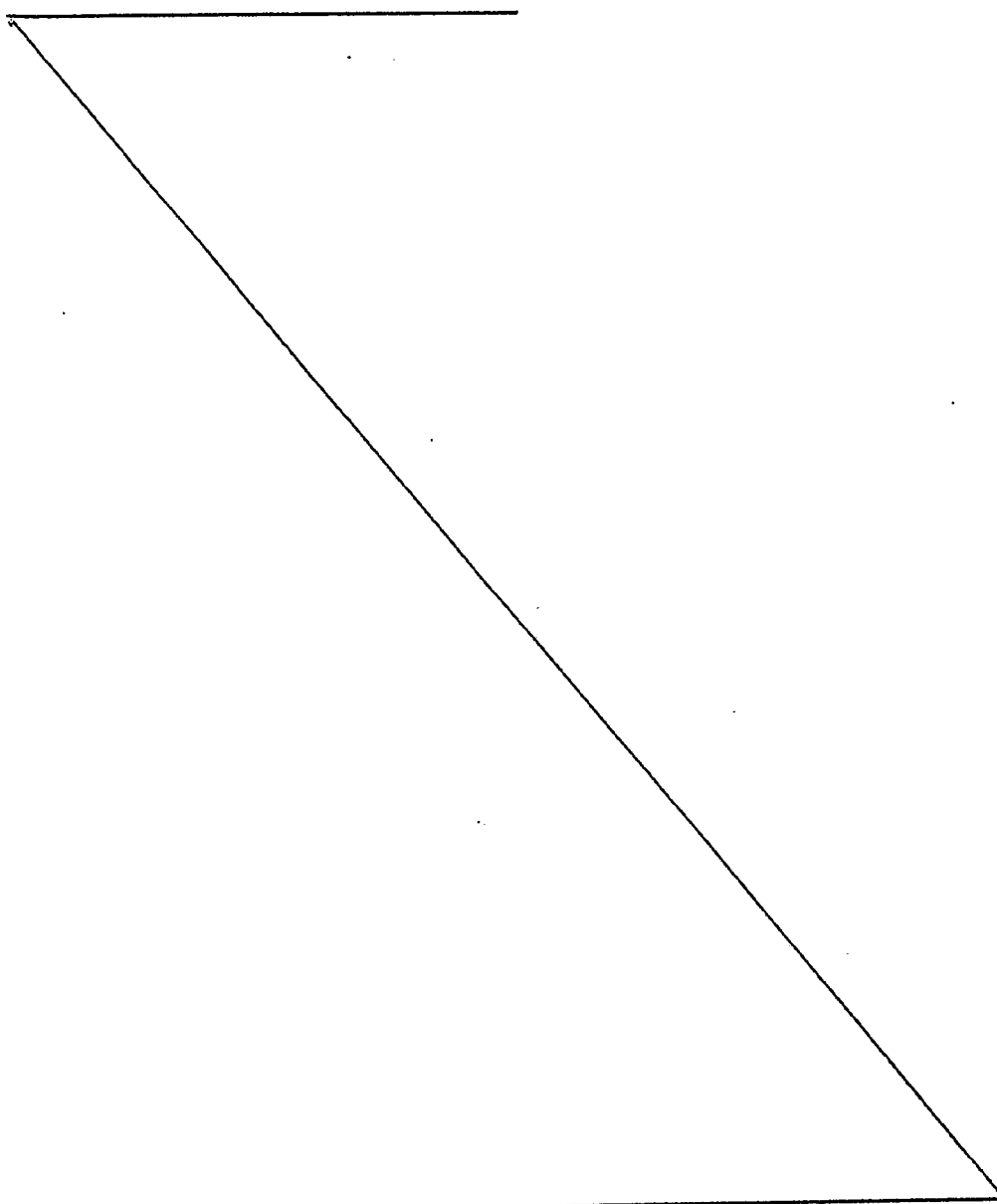
15 III : 892

Viridogriseina : 878

Para el estudio de la estructura química de
neoviridogriseinas I, II y III, estos tres nuevos antibióticos
y viridogriseina se hidrolizan durante la noche en hidróxido
20 sódico 0,1 N a temperatura ambiente y se metilan luego con
diazometano antes de la espectrometría de masa según el méto-
do de Compernelle et al. (Organic Mass Spectrometry, Vol. 6,
pp. 151-166, 1972). La estructura de neoviridogriseinas I, II
y III se determina a partir de la información disponible
25 descrita anteriormente, siendo:

agalactiae. Las concentraciones mínimas inhibitorias de los nuevos antibióticos depsipéptidos de esta invención se determinan por separado y junto con viridogriseina y griseoviridina sobre varios microorganismos por el método de dilución en tubo. Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

5



232

TABLA I: Valores de neoviridogriseinas I, II y III (mcg/ml)

Microorganismo (a)	Medio	NV* I	NV* II	NV* I
<u>Staphylococcus aureus</u> 209P	BHI #	0,2	0,1	0,2
(EM) ^r	BHI #	0,4	0,4	0,4
(STH) ^r	BHI #	0,8	0,8	1,6
(PC, TC, EM, LM) ^r 1	BHI #	6,25	6,25	6,25
(PC, TC, EM, LM) ^r 2	BHI #	6,25	6,25	6,25
(TC, EM, LM, CP) ^r	BHI #	6,25	6,25	6,25
(SM, STH) ^r	BHI #	0,4	0,2	0,2
(PC, KM, NM) ^r	BHI #	0,8	0,4	0,4
(EM, CM, SM, PC, TC) ^r	BHI #	0,4	0,2	0,4
(EM, OM) ^r	BHI #	0,8	0,4	0,8
(TC, CP, PC) ^r	BHI #	0,2	0,2	0,4
(BX-1633)(PC) ^r	BHI #	0,4	0,2	0,4
Russell(PC) ^r	BHI #	0,2	0,2	0,4
Smith	BHI #	0,2	0,2	0,2
<u>Staphylococcus</u> sp. (PC) ^r	BHI #	0,8	0,4	0,8
sp.	BHI #	0,8	0,8	0,8
<u>Diplococcus pneumoniae</u> tipo 1	BHI + HB } }	0,2	0,4	0,2
<u>Streptococcus pyogenes</u>	BHI + HB } }	0,4	0,2	0,4
<u>Sarcina lutea</u>	BHI #	0,2	0,4	0,4
<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	BHI #	0,4	0,4	0,8
<u>Salmonella gallinarum</u>	BHI #	> 25	> 25	> 25
<u>Escherichia coli</u>	BHI #	> 25	> 25	> 25
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	BHI #	> 25	> 25	> 25
<u>Proteus vulgaris</u>	BHI #	> 25	> 25	> 25
<u>Candida albicans</u>	MY ^{&}	> 25	> 25	> 25

**POOR
QUALITY**

232

III

NV [№] I	NV [№] II	NV [№] III	VG ^{№№}	NV [№] mix.	NV [№] +GV ^{№№} mix.
0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2
0,8	0,8	1,6	1,6	1,6	0,8
6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	3,2
6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	3,2
6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	3,2
0,4	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2
0,8	0,4	0,4	0,8	0,8	0,4
0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2
0,8	0,4	0,8	0,8	0,8	0,4
0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2
0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2
0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2
0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2
0,8	0,4	0,8	0,4	0,8	0,4
0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,4
0,2	0,4	0,2	0,4	0,4	0,1
0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	0,1
0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	0,1
0,4	0,4	0,8	0,8	0,8	0,4
> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25

333

POOR QUALITY

* NV = neoviridogriseina; ~~***~~ VG = viridogriseina;

~~***~~ GV = griseoviridina

(a) EM = eritromicina; STH = estreptotricina; PC = penicilina;

TC = tetraciclina; LM = leucomicina; CP = cloranfenicol;

5 SM = estreptomina; KM = canamicina; NM = neomicina;

OM = oleandomicina

()^r = resistente a las drogas entre paréntesis

BHI = caldo de infusión cerebro-corazón;

BHI + HB = caldo de infusión cerebro-corazón conteniendo 10%
de sangre de caballo;

10 & MY = medio de extracto de malta-extracto de levadura.

Como se muestra en la tabla de valores MIC indicada anteriormente, la neoviridogriseina II es más activa que la neoviridogriseina IV, es decir viridogriseina. Este experimento MIC está basado en el método de dilución doble. Para diferenciar neoviridogriseina II y viridogriseina en cuanto su actividad antibiótica, se repite la determinación de MIC con una velocidad de dilución bastante más baja. La siguiente tabla indica que la neoviridogriseina II es de dos a tres veces más activa que la viridogriseina.

20 Tabla 2: Comparación de neoviridogriseina II con viridogriseina

Microorganismo	MIC (mcg/ml)	
	NV [*] II	VG ^{***}
Staphylococcus aureus 209 P	0,078	0,133
(EM, CM, SM, PC, TC) ^r	0,125	0,334
(TC, CP, PC) ^r	0,094	0,334
Bx-1633(PC) ^r	0,125	0,267
Russell(PC) ^r	0,125	0,267
Smith	0,125	0,267

25

Medio: Caldo de infusión de cerebro-corazón.

Abreviatura: como anteriormente se ha indicado.

Cuando las concentraciones mínimas inhibitorias de neoviridogriseinas I, II y III son ensayadas en presencia de griseoviridina, se observa sinergismo entre el miembro de las neoviridogriseinas y la griseoviridina, tal y como es el caso entre viridogriseina y griseoviridina. Por consiguiente, el fenómeno sinérgico de los nuevos antibióticos de esta invención con griseoviridina fue estudiado más detalladamente con proporciones variadas de la mezcla de neoviridogriseina a griseoviridina. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3: Sinergismo de la mezcla de neoviridogriseinas con griseoviridina

	Mezcla de neoviridogriseinas	:	Griseoviridina	MIC* (mcg/ml)
15	100	:	0	0,313
	90	:	10	0,156
	80	:	20	0,125
	70	:	30	0,125
	60	:	40	0,094
20	50	:	50	0,078
	40	:	60	0,094
	30	:	70	0,125
	20	:	80	0,250
	10	:	90	0,250
25	0	:	100	0,250

*Microorganismo de ensayo: Sarcina lutea

Método de dilución en tubos con caldo de infusión cerebro-corazón.

A partir de la tabla anterior puede observarse que la acción sinérgica de la mezcla de neoviridogriseinas

con griseoviridinas es más significativa en la proporción de 50:50; es decir, una mezcla 1:1 de neoviridogriseinas y griseoviridina es de tres a cuatro veces más activa que las neoviridogriseinas o griseoviridina solamente.

5 La siguiente Tabla 4 registra la elevada actividad in vitro de neoviridogriseina II contra varias cepas de micoplasma así como el superior sinergismo mostrado por una mezcla de neoviridogriseina II-griseoviridina en comparación con una mezcla de viridogriseina-griseoviridina. Los valores MIC
10 fueron determinados por el método de dilución.

Tabla 4

<u>Microorganismo</u>	<u>Medio</u>	<u>NV II</u>	<u>VG</u>	<u>GV</u>	<u>NV II+GV*</u>	<u>VG+GV*</u>
Micoplasma gallisepticum KP 13	(1)	0,025	0,10	0,10	0,0063	0,025
Micoplasma pulmonis	(2)	0,78	1,56	6,25	0,20	0,39
15 Micoplasma fermentans	(2)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Micoplasma agalactiae PG 2	(2)	0,39	0,78	3,13	<0,05	0,39

Medio (1): Caldo de enriquecimiento PPLO (Eiken, Japón)
(2): Caldo PPLO (Medio de Chanock; Difco)

*Relación de mezcla: 50/50

20 NV II, VG, GV: véase tabla 1.

25 Como se ilustra anteriormente, las nuevas neoviridogriseinas I-III de la presente invención exhiben una actividad notable contra bacterias gram-positivas y cepas de micoplasma tanto solas como en diversas mezclas con viridogriseina (neoviridogriseina IV) y griseoviridina. Se ha encontrado que las proporciones en peso mutuas de neoviridogriseinas I-III, viridogriseina (neoviridogriseina IV) y griseoviridina en una mezcla, pueden variar dentro de límites

muy amplios, pero todavía se retienen las sorprendentes actividades antimicrobiales y anti-micoplasma. Como ejemplo representativo, aunque no limitativo, una mezcla que tiene la siguiente composición en porcentaje en peso:

5	Neoviridogriseina II	27%
	Neoviridogriseina II (viridogriseina)	23%
	Griseoviridina	50%

fue ensayado *in vitro* contra Streptococcus mutans, un microorganismo asociado con la caries dental y enfermedades periódontales. El ensayo fue realizado en caldo Todd Hewitt (Difco) con 0,05 % de hidrolisato de lactalbumina TC (Difco). El recuento inicial de organismos fue de aproximadamente 3×10^4 organismos por ml. Los tubos de cultivo fueron incubados anaerobicamente a 37°C durante 48 horas. La concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bacterial se encontraron ambas para una concentración de neoviridogriseina de 1 parte por millón (ppm).

En otro ejemplo representativo, aunque no limitativo, se ensayó la misma mezcla *in vitro* contra Treponema hydysenteriae, un organismo de la disentería porfina. La mezcla fue ensayada como diluciones en agar sanguíneo a concentraciones de 100, 50, 10, 5, 1, 0,5 y 0,1 ppm. Las placas fueron inoculadas con una escobilla e incubadas 4 días a 42°C. El valor MIC fue 0,5 ppm. En otro ejemplo representativo, aunque no limitativo, una mezcla con la siguiente composición en porcentaje en peso:

25	Neoviridogriseina II	25%
	Neoviridogriseina IV (viridogriseina)	25%
	Griseoviridina	50%

30 fue ensayada in vitro contra varias cepas de micoplasma.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC)
fueron las siguientes:

	Cepa	MIC
	Micoplasma gallisepticum KP13	0,07
5	Micoplasma pulmonis	0,20
	Micoplasma fermentans	0,05
	Micoplasma agalactiae	0,05

Estos tipos de mezclas de neoviridogriseinas-griseoviridina son también útiles en el tratamiento de animales que sufren enfermedades infecciosas causadas por las anteriores bacterias patogénicas.

Puesto que las micamicinas A y B, como se conoce ya, resultan muy eficaces como aditivos alimenticios, los nuevos antibióticos de esta invención son sometidos al ensayo de alimento para animales. Se añadieron las neoviridogriseinas, como una mezcla, al alimento para pollos en una proporción de 2-20 ppm suministrándose a pollos macho durante 10 semanas. En comparación con el grupo de control de pollos que recibió la misma alimentación pero sin neoviridogriseinas, los pollos alimentados con neoviridogriseinas fueron superiores en cuanto a la velocidad de aumento de peso corporal y eficacia de alimentación. De este modo, las neoviridogriseinas de esta invención han resultado ser muy útiles como aditivos alimenticios.

Igualmente, las composiciones que contienen una o más neoviridogriseinas I-III, opcionalmente en mezcla con viridogriseina (neoviridogriseina IV) y griseoviridina, en donde las proporciones en peso mutuas de los componentes pueden variar dentro de amplios límites, resultaron ser de mucha utilidad como alimentos alimenticios.

Como ejemplo representativo, pero no limitativo,

una mezcla que tenía la siguiente composición en porcentaje en peso:

Neoviridogriseina II 27 %
 Neoviridogriseina IV (viridogriseina) 23 %
 5 Griseoviridina 50 %

fue ensayada in vivo por incorporación en la dieta de pollos en crecimiento. Se emplearon pollos de 1 día de edad, quince de ellos por tratamiento. Los pollos fueron mantenidos durante 11 días con un alimento conteniendo aproximadamente 55 %
 10 de grano de centeno, suplementado con vitaminas, minerales, grasas y fuentes proteínicas. El alto contenido en grado de centeno proporciona normalmente un crecimiento pobre a moderado y esta dieta constituye una de las normales utilizadas para evaluar los promotores de crecimiento y aditivos alimenticios antibióticos. Como control positivo se utilizó penicilina (100 ppm). Los datos se ofrecen a continuación. La relación alimentación/ganancia es los gramos alimentados y consumidos por gramo de peso ganado. La relación peso corporal es la relación del peso corporal del pollo al final del 11 día
 15 de estudio con respecto al peso corporal inicial. La última columna es la ganancia media por ave (en gramos).
 20

TRATAMIENTO	CONC. DIETA PPM	RELACION ALIMENTACION/GANANCIA	RELACION PESO CORPORAL	GANANCIA MEDIA POR AVE (GRAMOS)
Centeno, Control	---	1,334	4,696	156,47
25 Penicilina	100	1,197	5,012	163,20
Mezcla ensayada	100	1,256	4,789	161,66
"	50	1,283	4,892	163,47
"	25	1,204	5,226	174,67

A continuación se ilustra adicionalmente la invención mediante ejemplos preferidos, los cuales no deberán ser considerados como limitativos de la invención.

EJEMPLO 1

5 Un medio de cultivo de semillas consistente en 0,5 % de harina de soja, 0,5 % de Pharmamedia (Traders Oil Mill Co.), 0,5 % de harina de avena, 0,5 % de levadura seca y 0,5 % de molasas de remolacha, se ajusta a pH 6,5 y se distribuye en una cantidad de 50 ml en un matr az Erlenmeyer de 250 ml. Despu es de autoclavar a 120 C durante 15 minutos, se inocula una cantidad de Streptomyces sp. P 8648 sobre un tubo inclinado de agar ISP-2 y el matr az se incuba a 28 C durante 48 horas en un sacudidor rotativo. Se transfieren 2 ml de dicho cultivo de semilla a un matr az Erlenmeyer de 500 ml

10

15 conteniendo 100 ml del siguiente medio de fermentación:

Harina de soja	0,5%	
Harina de cacahuete	0,5%	
Harina de avena	0,5%	(pH 6,5 antes del autoclaveado)
Levadura seca	0,5%	
20 Molasas de remolacha	0,5%	

y se cultiva a 28 C durante 96 horas en un sacudidor rotativo a 200 rpm (rayo de círculo 3,5 cm). El caldo de cultivo se recoge de 12 matraces y se filtra para dar un filtrado de caldo claro. La torta obtenida en el filtro se lava con 100 ml de agua. Se combinan el agua de lavado y el filtrado de caldo.

25 La actividad antibiótica de esta solución (pH 8,3) es de 23 mm sobre una placa de ensayo de agar nutriente de Sarcina lutea cuando se lleva a cabo el ensayo de disco normalizado con un disco de papel de 8 mm. Se extractan dos veces 800 ml de la citada solución acuosa con 200 ml, cada vez, de n-butanol y

30 los extractos butanólicos se combinan y evaporan hasta seque-

dad bajo presión reducida, para dar 90 mg de polvo en bruto de neoviridogriseinas y griseoviridina. Este polvo en bruto se mezcla con una pequeña cantidad de gel de sílice y se aplica en una columna de gel de sílice (Waco-Gel C-100, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; 1,5 x 25 cm.). La columna de gel de sílice se eluye primero con 300 ml de una mezcla benceno-acetona (5:1) y luego con una mezcla de benceno-acetona (2:1). Se recogen fracciones de 10 g en un recogedor automático de fracciones. Las fracciones activas Nos. 25 a 35 se combinan y evaporan hasta sequedad para proporcionar 30 mg de mezcla de neoviridogriseinas (consistente en neoviridogriseinas I, II y III y viridogriseina). En adición, la evaporación de las fracciones activas Nos. 45-54 hasta sequedad proporciona un polvo en bruto, cuya actividad antibiótica corresponde a griseoviridina, según cromatografía de capa fina. Estos dos preparados se someten a cromatografía de capa fina bajo las condiciones indicadas. La actividad antimicrobial se detecta sobre una placa de ensayo de agar nutriente de Sarcina lutea. Placa TLC : Placa TLC pre-revestida SILICA GEL 60 F-254, E. Merck, Darmstadt.

(1) Disolvente : Cloroformo : metanol = 20 : 1

Neoviridogriseinas Rf = 0,45

Griseoviridina 0,05

(2) Disolvente : Benceno : acetona = 1:1

Neoviridogriseinas Rf = 0,55

Griseoviridina 0,13

EJEMPLO 2

Se inoculan 200 ml del cultivo de 48 horas de Streptomyces sp. P8648 en el mismo medio de cultivo que en el ejemplo 1, en un fermentador de jarra de acero inoxidable de

15 litros conteniendo 10 litros del mismo medio de cultivo de semillas del ejemplo 1, y se cultiva a 27-28°C durante 96 horas, bajo aireación forzada de 5 litros/minuto de aire estéril. La agitación, durante el cultivo, se efectúa a 200 rpm con un impulsor, cuyo radio es aproximadamente 1/4 del diámetro del fermentador tipo jarra. Al final de la fermentación, se separan por filtración las micelas y los sólidos. El filtrado de caldo obtenido se ajusta a pH 6 y se extrae cuatro veces con 2 litros, cada vez, de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinan, se secan sobre sulfato sódico anhidro y se evaporan hasta sequedad bajo presión reducida, para dar 700 mg de neoviridogriseinas y griseoviridina en bruto. El polvo en bruto recuperado de neoviridogriseinas y griseoviridina se disuelve en una pequeña cantidad de metanol y se carga en una columna Sephadex LH-20 (3 x 50 cm.). Se recogen fracciones de 10 ml con metanol como disolvente de elución. Las neoviridogriseinas son localizadas en las fracciones Nos. 22-29. Estas fracciones se recogen, se concentran hasta sequedad y se purifican adicionalmente por cromatografía en columna de gel de sílice (SILICAR CC-7 Special; Mallinckrodt Chemical Works; 1,5 x 20 cm). La elución se efectúa con una mezcla de cloroformo y metanol (30:1). Se combinan ocho fracciones de 5 g de las fracciones No. 5 a 12 y se evaporan hasta sequedad bajo presión reducida, para dar 25 mg de polvo blanco de neoviridogriseinas. La composición en porcentaje de neoviridogriseinas I, II y III y viridogriseina en este polvo, es como sigue:

Neoviridogriseina I	: 15%
II	: 20%
III	: 20%
Viridogriseina	: 45%

Por cromatografía de capa fina se encuentra que la griseoviridina está localizada en las fracciones Nos. 30-34 de la columna Sephadex LH-20. Estas fracciones activas se combinan, se evaporan hasta sequedad bajo presión reducida y se cristalizan en metanol caliente para dar 30 g de cristales tipo aguja de griseoviridina. La identidad de estos cristales con griseoviridina se comprueba por cromatografía de capa fina y según otras determinaciones físico-químicas.

EJEMPLO 3

Se efectua la misma fermentación descrita en el ejemplo 1 durante 96 horas, excepto que el medio de fermentación está compuesto de 0,5 % de harina de soja, 0,5 % de Pharmamedia, 0,5 % de harina de avena, 0,5 % de levadura seca, 0,5 % de molasas de remolacha y 0,1 % de ácido DL-alfa-amino-n-butírico (pH 6,5). El caldo de fermentación se recoge de 13 matraces y se filtra. El líquido filtrado se extracta dos veces con 300 ml, cada vez, de n-butanol. La separación del n-butanol de los extractos deja unos 70 mg de polvo en bruto de neoviridogriseina y griseoviridina. Este polvo en bruto se analiza por cromatografía de capa fina sobre gel de sílice seguido por bio-autografía sobre Sarcina lutea como organismo de ensayo. La placa de cromatografía de capa fina (TLC) empleada en este ensayo es un producto de E. Merck, Darmstadt (Placa TLC pre-revestida SILICA GEL 60 F-254). Los valores Rf obtenidos y los sistemas disolvente empleados, son los siguientes:

Cloroformo:metanol	20:1	30:1	40:1
Neoviridogriseina I	Rf=0,60	0,39	0,20
II	0,56	0,32	0,16
III	0,50	0,19	0,13
Viridogriseina	0,43	0,18	0,10
Griseoviridina	0,05	0,02	0,00

EJEMPLO 4

50 ml del medio de cultivo de semillas que contiene 0,3 % de extracto de carne, 0,5 % de triptona (Difco Laboratories), 0,1% de glucosa, 2,4 % de almidón soluble, 0,5 % de extracto de levadura, 0,4 % de carbonato de calcio y 0,5 % de harina de soja (pH 7), se distribuyen en un matr az Erlenmeyer de 250 ml y se autoclavea a 120 C durante 15 minutos. Se germinan esporas de Streptomyces sp. P 8648 sobre un tubo inclinado de agar en dicho matr az y se sacude el cultivo a 25 C durante 3 días para suministrar el cultivo de semillas. El medio de fermentación está compuesto de 0,5 % de almidón soluble, 2% de glucosa, 1% de Pharmamedia, 0,5% de harina de avena, 0,5% de licor de maceración de maíz, 0,05 % de fosfato dipotásico y 0,05 % de sulfato de magnesio (pH 6,5). Se colocan 50 ml de este medio de fermentación en un matr az c nico de 250 ml y se autoclavea a 120 C durante 15 minutos. El tamaño del inóculo es de 2% (v/v). El caldo de fermentación se inocula con el citado cultivo de semilla y se incuba a 25 C en un sacudidor rotativo. Transcurridas 20   48 horas desde la inoculación, se añade una solución esterilizada de casamino  cido (Difco Laboratories) o prolina (pH 7) a una concentración final de 0,4 % y se continúa la fermentación. 4 días después de la inoculación, el caldo de fermentación se filtra y el filtrado se extracta dos veces con un volúmen igual de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinan y evaporan a un polvo seco bajo presión reducida. Este polvo en bruto se recibe en acetato de etilo y una cantidad alicuota de la solución se mancha cuantitativamente sobre una placa de cromatografía de capa fina (TLC) de gel de sílice. La placa TLC se desarrolla en un sistema disolvente de cloro-

formo y metanol (50:1) y el disolvente se evapora en aire). La misma placa TLC se desarrolla de nuevo en dicho sistema disolvente de cloroformo y metanol (50:1). Cada componente de neoviridogriseina se localiza bajo luz ultravioleta (3650 Å), se raspa de la placa TLC y se suspende en un volumen conocido de metanol. Después de separar el gel de sílice por decantación, se determina la cantidad de antibióticos en los extractos por el método de ensayo UV, sabiendo que el valor epsilon a 305 nm es de 8000. Los resultados del ensayo UV son los siguientes:

	Ninguno	Aminoácido añadido <u>Casaminoácido</u>	Prolina
Neoviridogriseina I	2%	2%	2%
II	9	40	60
III	4	3	3
Viridogriseina	85	55	35

EJEMPLO 5

Se preparan unos 10 litros del cultivo de semillas de 23 horas en un fermentador de jarra bajo las mismas condiciones descritas en el ejemplo 2. El medio de fermentación (600 litros) comprendiendo 0,5 % de harina de soja, 0,5 % de Pharmamedia, 0,5 % de harina de avena, 0,5 % de levadura seca, 0,5 % de molasas de remolacha y 0,1 % de ácido DL-alfa-amino-n-butírico (pH ajustado a 6,5 antes del autoclaveado) y se esteriliza con vapor de agua a 120°C durante 15 minutos en un fermentador tipo tanque de acero inoxidable de 1.400 litros y se enfría a 28°C. A este tanque fermentador, se añade 10 litros del citado cultivo de semillas y se cultiva a 28°C durante 75 horas bajo aireación forzada con agitación a 180 rpm (por medio de un doble impulsor; rayo de círculo 1/4 del diámetro del tanque fermentador), alimentándose aire

estéril a una velocidad de 300 litros/minuto a través de un pulverizador situado en el fondo del tanque. Al final de la fermentación, el caldo se filtra a través de un filtro prensa. El filtrado de caldo se extracta dos veces con 150 litros, cada vez, de n-butanol. Los extractos n-butanólicos se combinan, se lavan con un pequeño volumen de solución saturada de cloruro sódico y se concentra a 2 litros en un evaporador rotativo. En este momento, se añaden 20 g de gel de sílice (WAKOGEL C-100, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se continúa adicionalmente la concentración en un evaporador rotativo hasta completa sequedad. La mezcla obtenida de antibióticos-gel de sílice se suspende en una pequeña cantidad de cloroformo y se coloca en la parte superior de una columna de gel de sílice (WAKOGEL C-100; 6,5 x 75 cm). La elución de las actividades antibióticas se efectúa por etapas en primer lugar con 7 litros de cloroformo, luego con 10 litros de una mezcla de cloroformo y metanol (50:1) y finalmente con metanol. Las fracciones Nos. 16-29 (300 g/fracción) que resultaron ser bioactivas sobre Sarcina lutea (neoviridogriseinas) son recogidas y concentradas hasta sequedad bajo presión reducida para un polvo en bruto de neoviridogriseina. Este polvo en bruto se disuelve en un pequeño volumen de metanol y se pasa a través de una columna Sephadex LH-20 (7 x 45 cm), eluyéndose cada fracción (100 g) con metanol. Se recogen aproximadamente 15 g de polvo en bruto de mezcla de neoviridogriseinas de las fracciones 6-15 después de separar el disolvente por evaporación. Las fracciones Nos. 50-60 de la citada columna de gel de sílice contienen griseoviridina. Se repite un procedimiento de purificación similar con Sephadex LH-20 (tamaño de la columna 7 x 45 cm) al empleado para la mezcla de neovirido-

griseinas, para proporcionar 4 g de griseoviridina en bruto.

EJEMPLO 6

Para la purificación final se utiliza la cromatografía de capa fina preparativa con una placa TLC de gel de sílice. Se disuelve 1 g de la mezcla de neoviridogriseinas en bruto preparada en el ejemplo 5 en 2 ml de acetato de etilo y se aplica a modo de bandas sobre placas TLC de gel de sílice (placa TLC pre-revestida SILICA GEL 60 F-254). Estas placas TLC se desarrollan primero con un sistema disolvente de cloroformo y metanol (50:1). Después de evaporar el disolvente en aire, las placas TLC citadas son sometidas a un segundo desarrollo con un sistema disolvente de cloroformo y metanol (25:1). Las neoviridogriseinas I, II y III y la viridogriseina fueron marcadas sobre las placas TLC bajo luz ultravioleta (3650 Å; BLAK-RAY UVL-22, Ultra-Violet Products, Inc.) y raspadas después de la elución. Cada componente de neoviridogriseina fue eluído con una pequeña cantidad de metanol y evaporado hasta sequedad. La cantidad recuperada de cada componente neoviridogriseina en estado puro es como sigue:

Neoviridogriseina I : 16,7 mg (menos pura, oleosa)
 II: 11,1 mg (polvo blanco)
 III: 15,2 mg (polvo blanco)
Viridogriseina : 30,0 mg (polvo blanco)

Se hidrolizan aproximadamente 5 mg de cada una de las neoviridogriseinas en ácido clorhídrico 6N a 110°C durante 36 horas en un tubo sellado, y se someten a cromatografía de capa fina, cromatografía de papel, electrofóresis de papel a elevada tensión y autoanálisis de aminoácidos. En cada componente se encuentra la presencia de los siguientes compuestos constituyentes:

5	Neoviridogriseina I	: ácido 3-hidroxi-picolínico treonina leucina prolina sarcosina beta,N-dimetil-leucina ácido alfa-amino-n-butírico fenilsarcosina
10	Neoviridogriseina II	: ácido 3-hidroxipicolínico treonina leucina prolina sarcosina beta,N-dimetil-leucina alanina fenilsarcosina
15	Neoviridogriseina III	: ácido 3-hidroxi-picolínico treonina leucina hidroxiprolina sarcosina beta,N-dimetil-leucina ácido alfa-amino-n-butírico fenilsarcosina
20	Viridogriseina	: ácido 3-hidroxipicolínico treonina leucina hidroxiprolina sarcosina beta,N-dimetil-leucina alanina fenilsarcosina
25		
30		

En adición, la identidad de neoviridogriseina IV con viridogriseina se confirma adicionalmente por espectrometría IR, UV, NMR y de masa, cromatografía de capa fina, análisis de hidrolisato y espectrometría antimicrobial. Por otro lado, el preparado de griseoviridina obtenido en el ejemplo 5 se cristaliza en metanol caliente para dar cristales tipo aguja. A continuación, se compara una parte de las agujas y se identifican con una preparación auténtica de griseoviridina mediante espectrometría IR, UV, NMR y de masa, cromatografía de capa fina, análisis elemental y otras propiedades físico-químicas.

Descripción de los dibujos

Figura 1: Espectro UV de neoviridogriseina I (NVG I) en metanol

Figura 2: Espectro UV de neoviridogriseina II (NVG II) en metanol

Figura 3: Espectro UV de neoviridogriseina III (NVG III) en metanol

Figura 4: Espectro UV de neoviridogriseina IV (NVG IV, VG) en metanol

Figura 5: Espectro UV de neoviridogriseina I (NVG I) en metanol/NaOH 0,1N

Figura 6: Espectro UV de neoviridogriseina II (NVG II) en metanol/NaOH 0,1N

Figura 7: Espectro UV de neoviridogriseina III (NVG III) en metanol/NaOH 0,1N

Figura 8: Espectro UV de neoviridogriseina IV (NVG IV, VG) en metanol/NaOH 0,1N

Figura 9: Espectro IR de neoviridogriseina I (NVG I)-tableta KBr

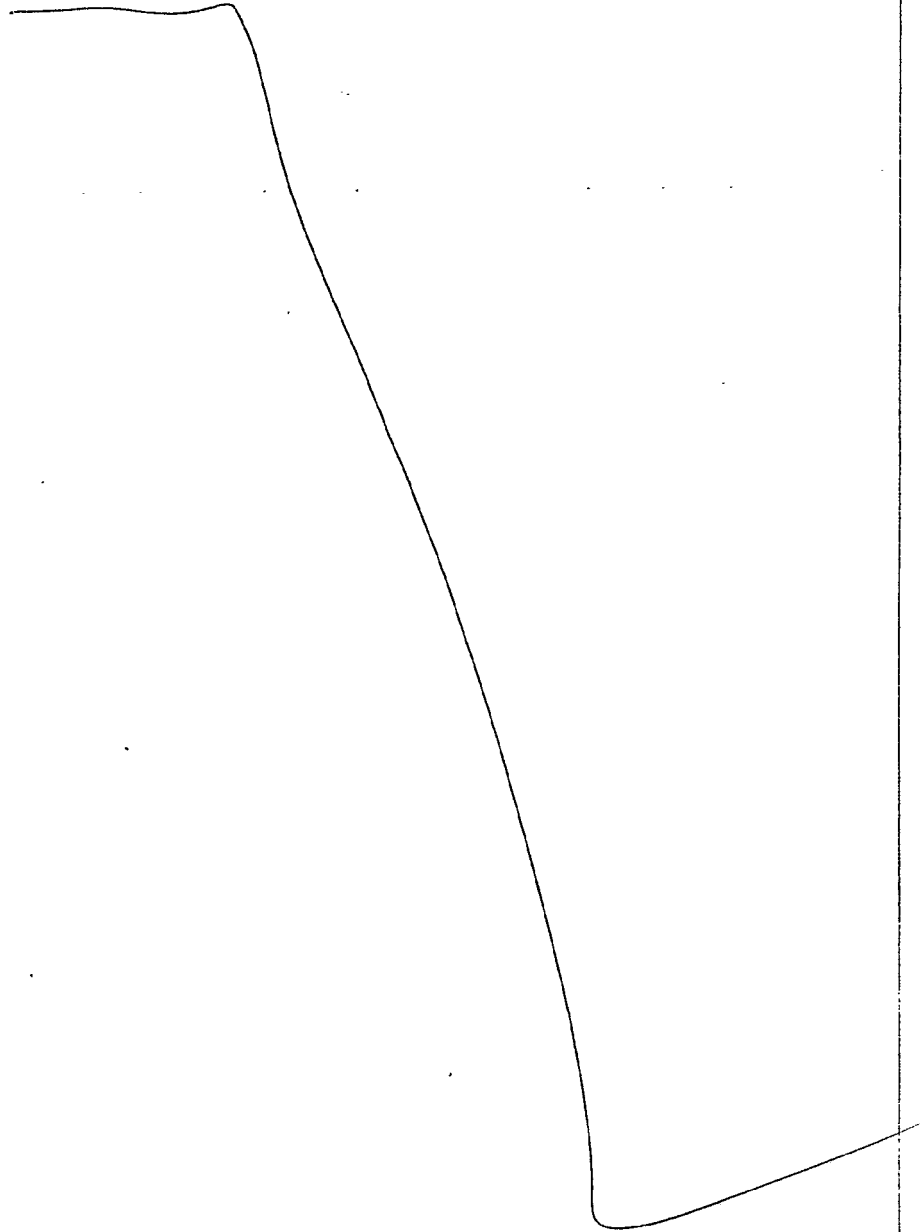
Figura 10: Espectro IR de neoviridogriseina II (NVG II)-tableta KBr

Figura 11: Espectro IR de neoviridogriseina II (NVG II)-tableta KBr

Figura 12: Espectro IR de neoviridogriseina IV (NVG IV, VG)-tableta KBr.

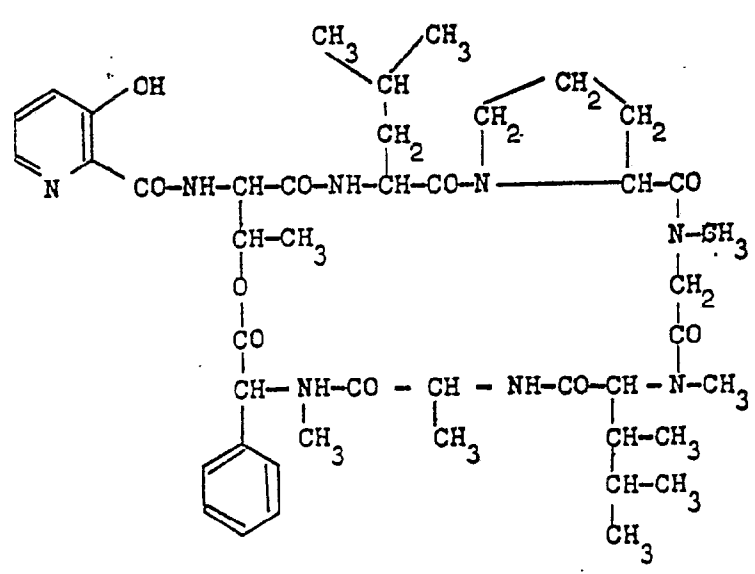
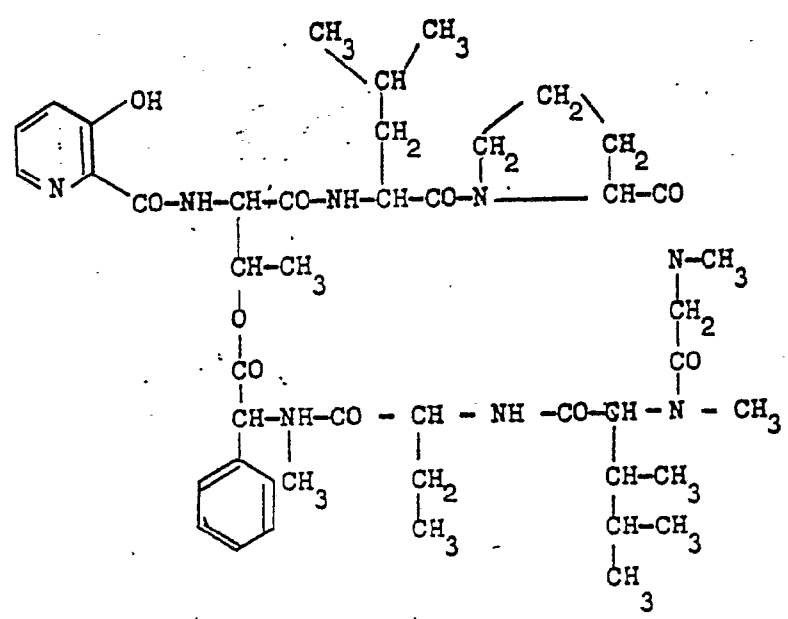
Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

5

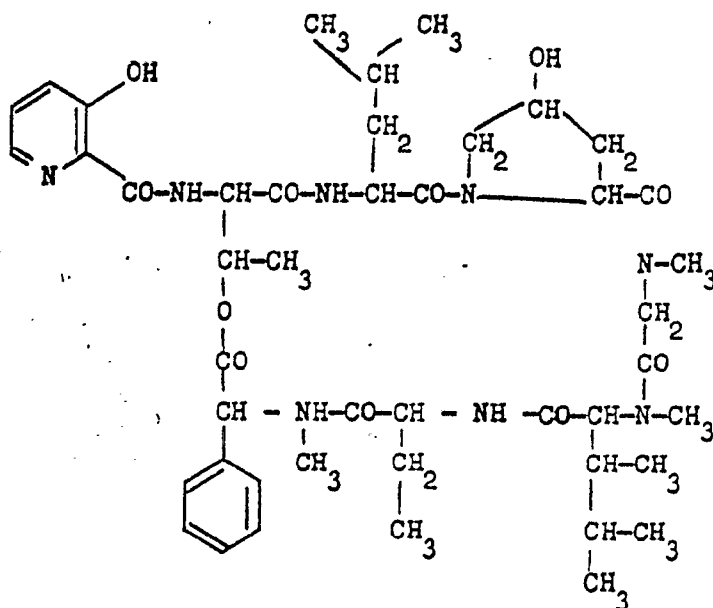


REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para preparar antibióticos depsipéptidos de neoviridogriseinas I, II y III, que tienen respectivamente las fórmulas:



mGe



5 caracterizado porque comprende cultivar Streptomyces sp. P8648 (FERM-P3562) bajo condiciones aeróbicas, a una temperatura comprendida entre 18 y 37°C, en un medio nutriente acuoso que contiene fuentes asimilables de carbono, fuentes asimilables de nitrógeno y sales minerales esenciales, a un pH comprendido entre 6 y 9 aproximadamente, hasta que se imparte al medio una actividad antibiótica sustancial; recuperar el producto de fermentación del medio; y, opcionalmente, aislar las neoviridogriseinas I, II y III como componentes simples.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque además de las neoviridogriseinas I, II y III, se obtienen simultáneamente viridogriseina y griseoviridina.

15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fermentación se efectúa en presencia de ácido alfa-amino-n-butírico y/o fuentes naturales que contienen ácido alfa-amino-n-butírico.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, ca-

mce

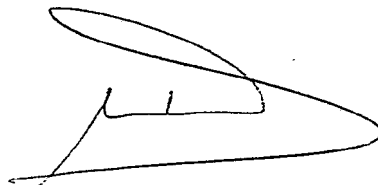
racterizado porque la fermentación se efectua en presencia de prolina y/o una fuente natural que contiene prolina.

5 5.- Procedimiento para preparar antibióticos depsipéptidos de neoviridogriseinas I, II y III, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjuntos.

Esta Memoria consta de 43 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

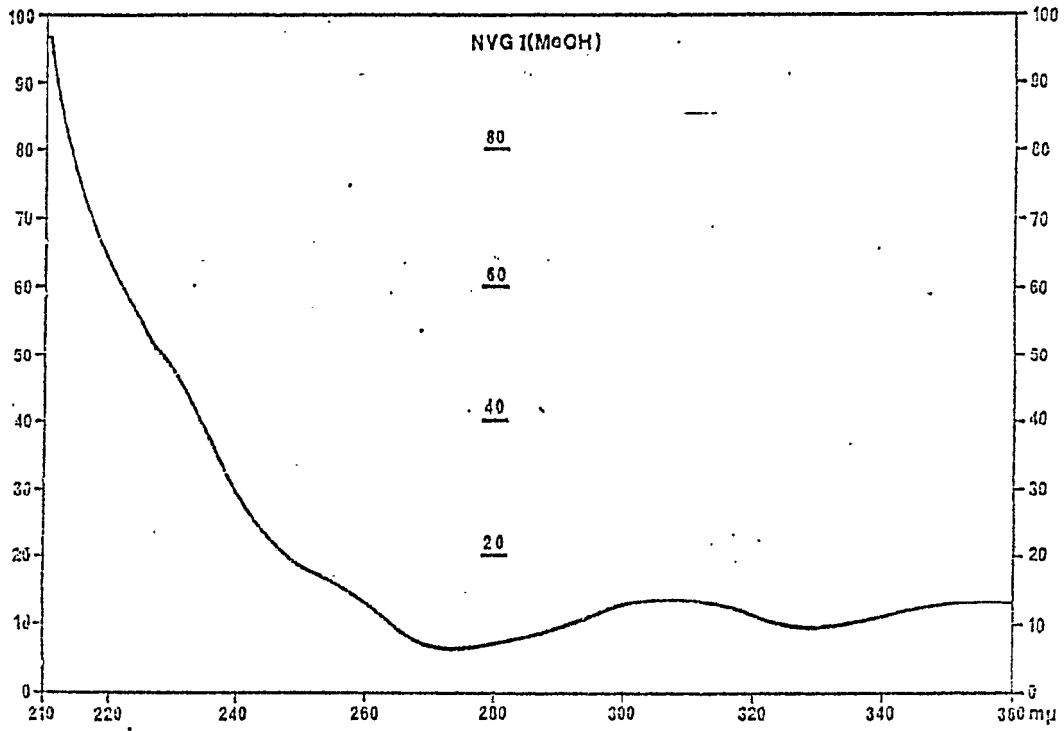
PANLABS INC.



10

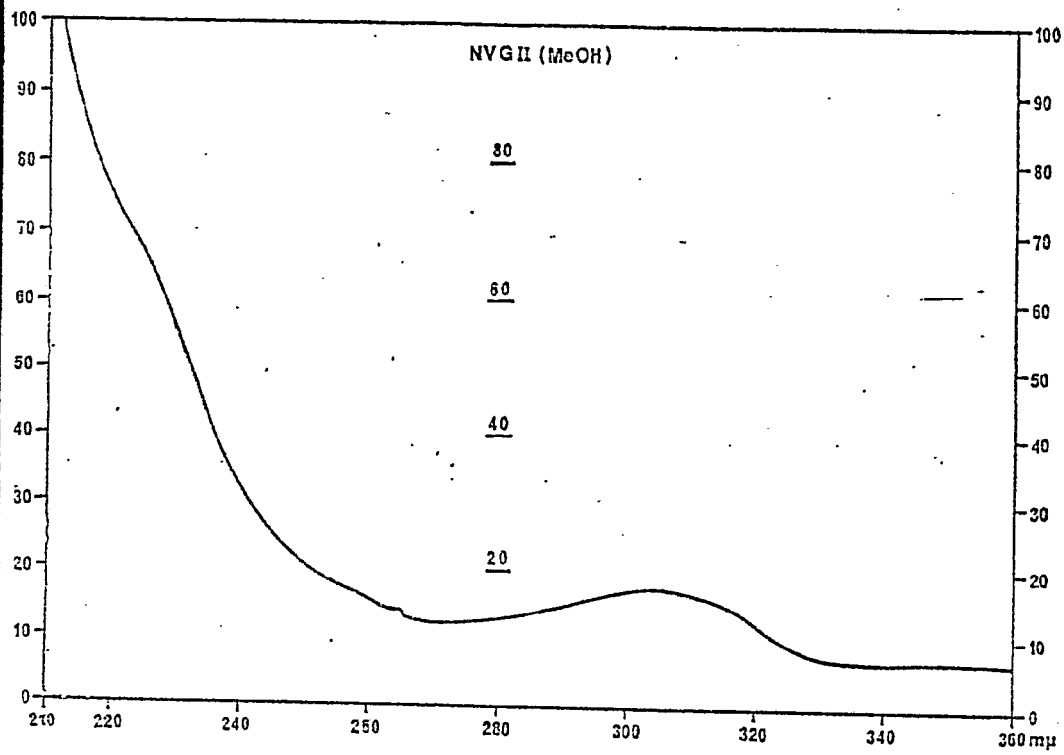
me

FIG. 1



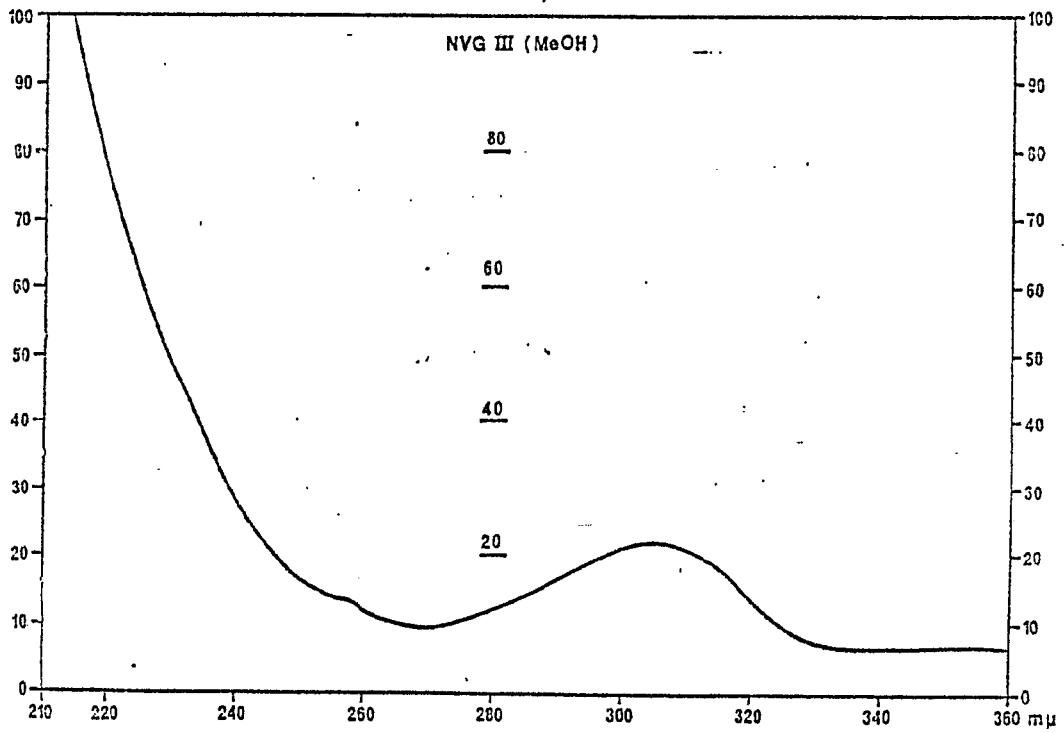
EPMA
VAL
15 DIC 1977

FIG. 2



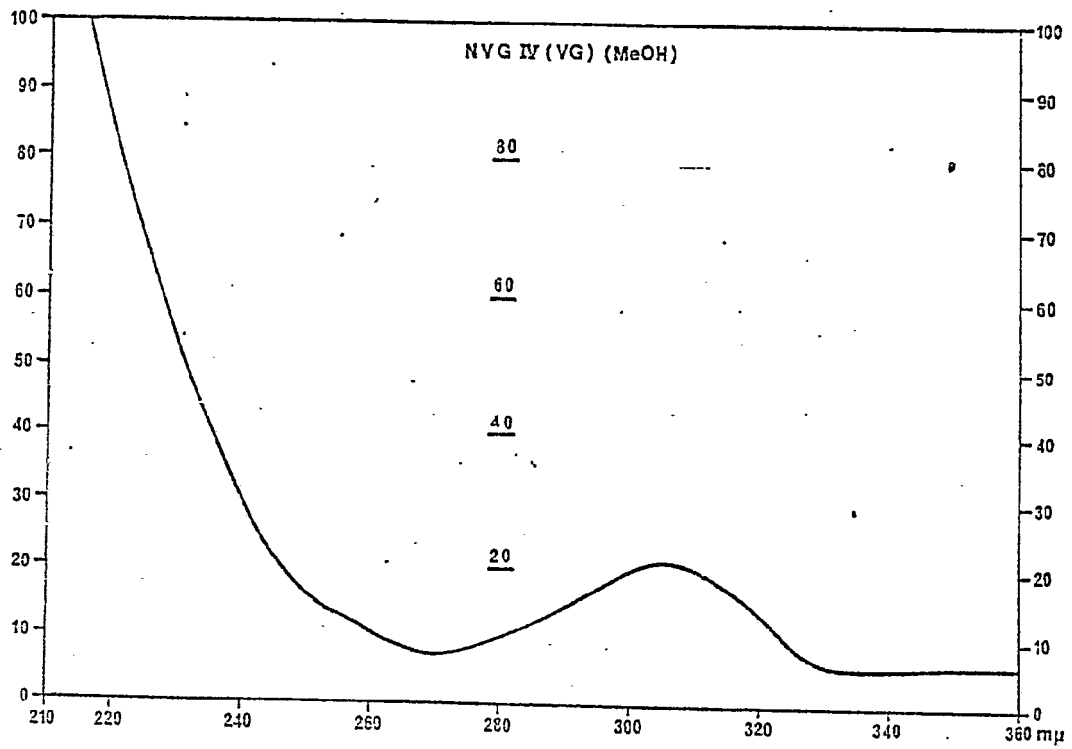
5 DIC. 1977

FIG. 3



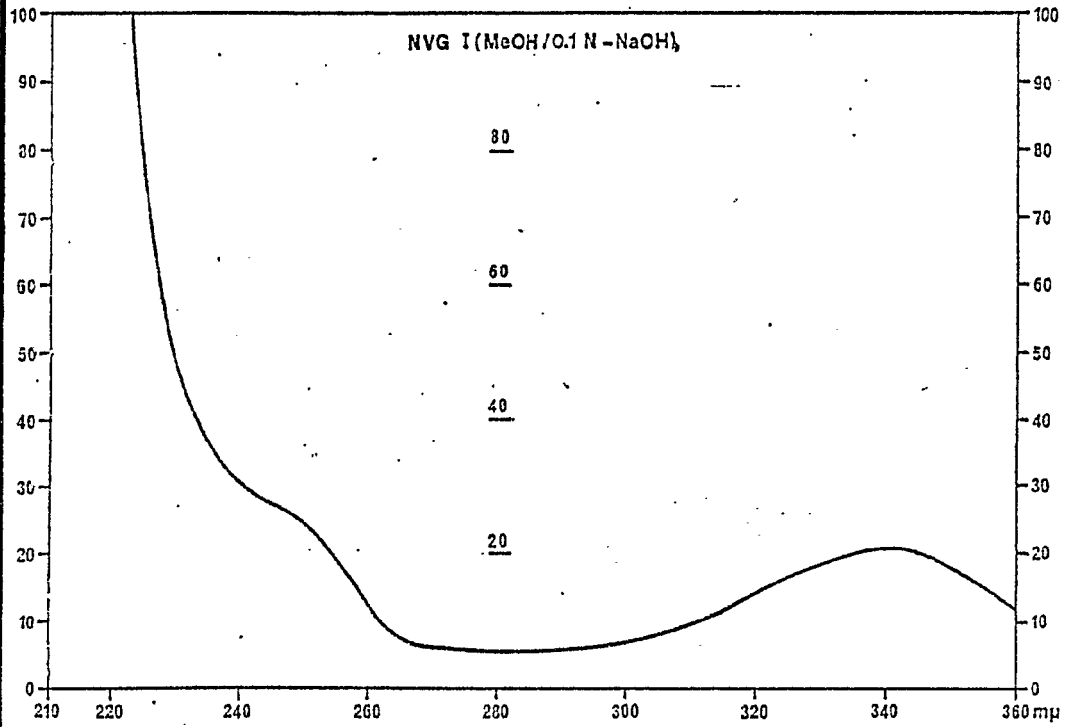
5 DIC. 1977

FIG. 4



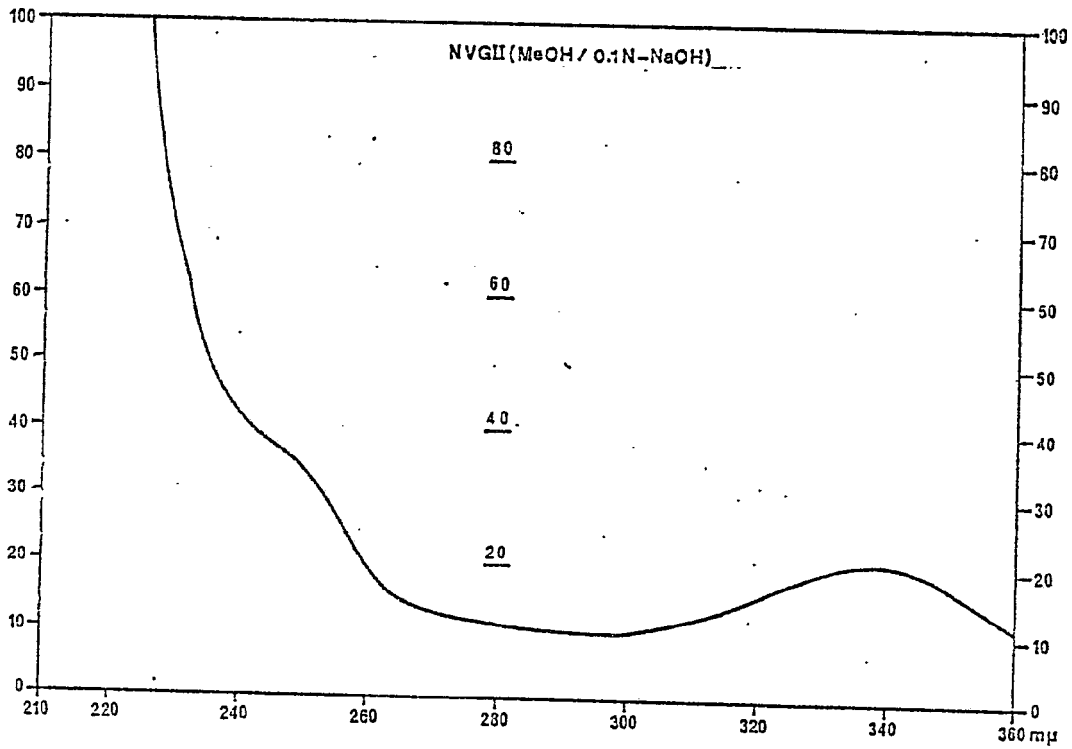
5 DEC 1977

FIG. 5



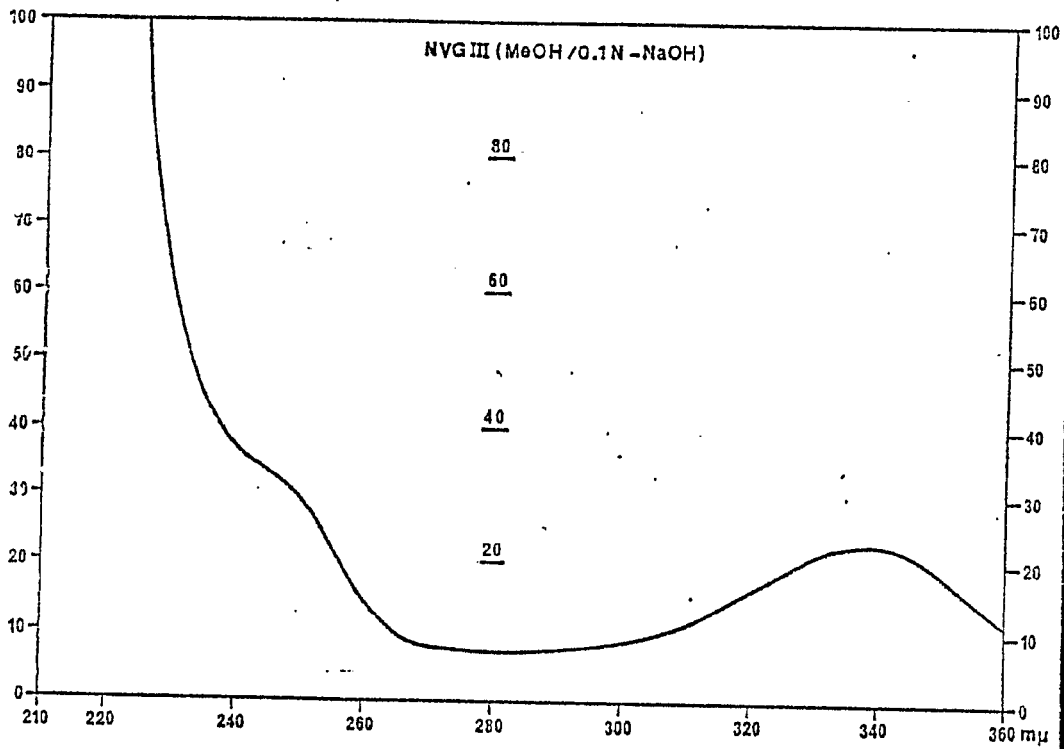
5 DIC. 1977

FIG. 6



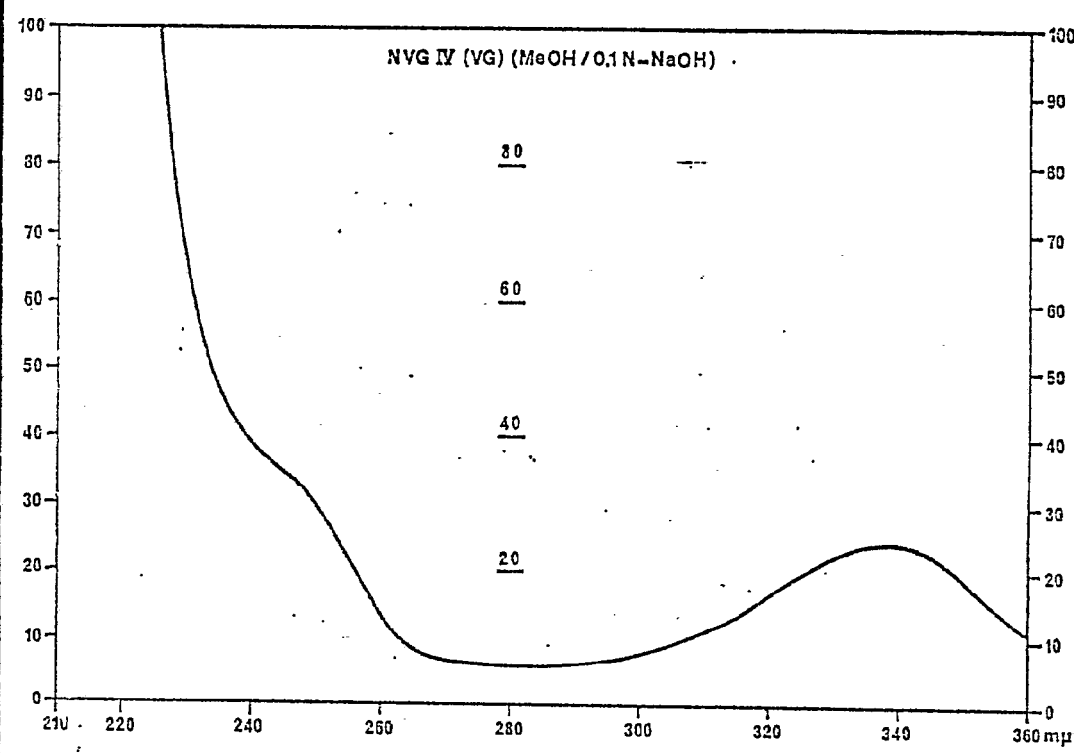
APR 15 1977

FIG. 7



ESCOLA
VARIANTE
- 11 JUL 1977

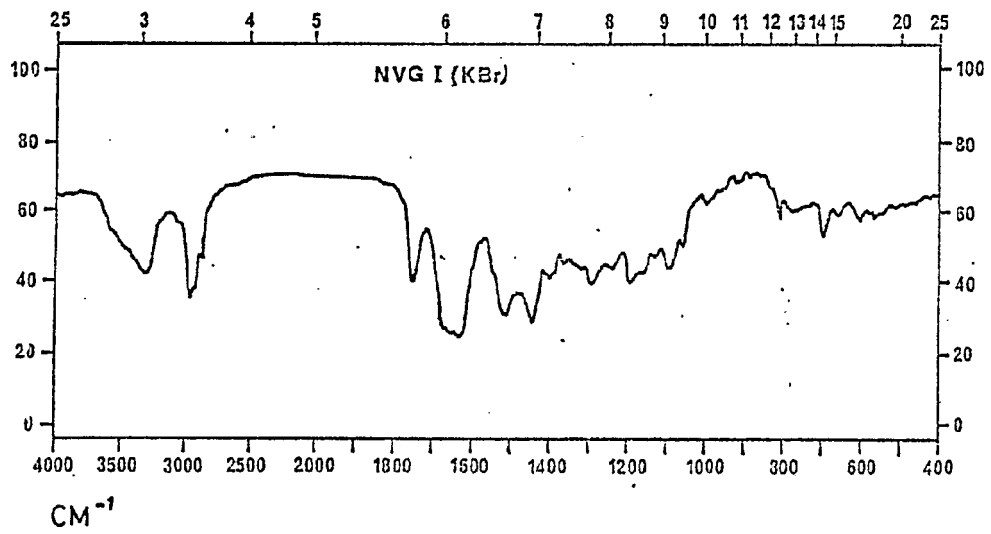
FIG. 8



ESCALA
VARIABLE

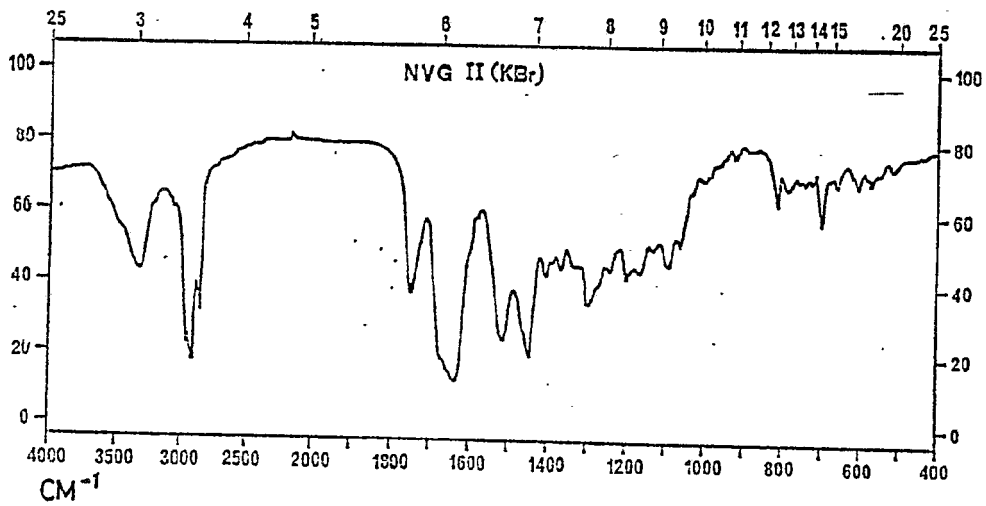
5 DIC. 1977

FIG. 9



- 5 DIC. 1977

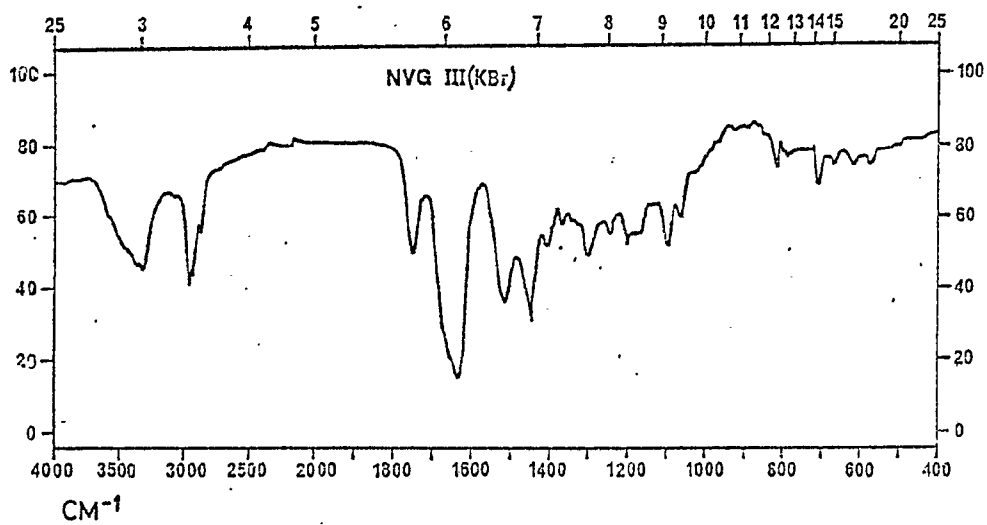
FIG. 10



- 5 DIC. 1977

[Handwritten signature]

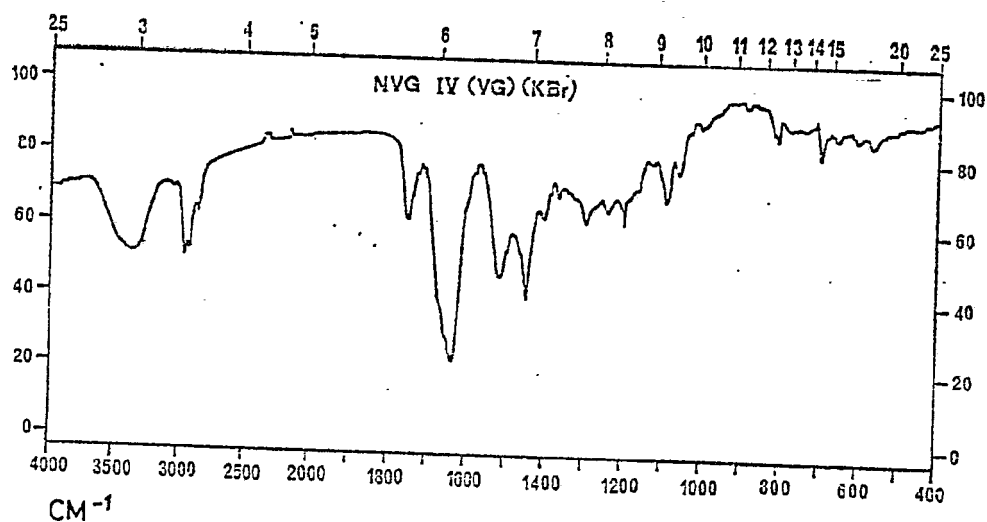
FIG. 11



EDC 21 A
VAL...
- 5 DIC. 1977

[Handwritten signature]

FIG. 12



ESCALA
VARIABLE
6 JUN 1977

J. M. GOMEZ NUNEZ Y PARRA
En su Representación: J. Suarez Diaz