

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19	ES	11	NUMERO	10	A1
		21	<b>461702</b>		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			<b>5 AGO. 1977</b>		

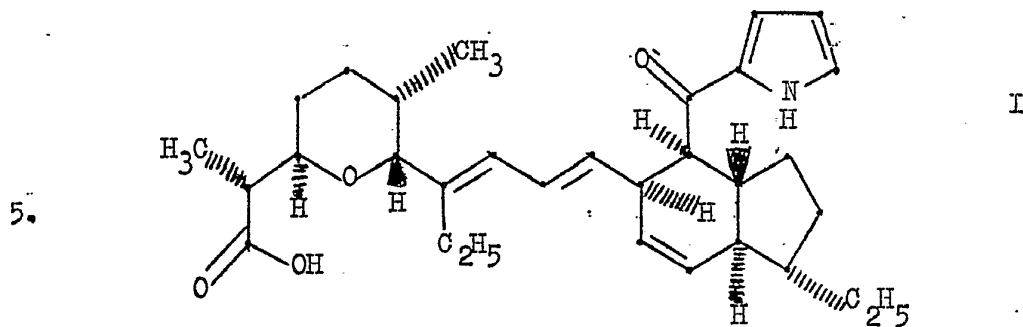
(RAN 4410/112)

**PATENTE DE INVENCION**

60 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
712.286	6 Agosto 1976	U.S.A.
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	CO 7D//A61K	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA NUEVA SUBSTANCIA ANTIBIOTICA"		
71 SOLICITANTE (S)		
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
BASILEA (Suiza)		
72 INVENTOR (ES)		
John Westley y Chao-Min Liu		
73 TITULAR (ES)		
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.		
74 REPRESENTANTE		
D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.		

MEMORIA DESCRIPTIVA

El invento se refiere a una nueva sustancia  
antibiótica de la fórmula



10. y a sus sales aceptables en farmacia. Este antibiótico exhibe propiedades ionofóricas y se clasifica como un antibiótico de grupo polietéreo. El antibiótico de la fórmula I y sus sales aceptables en farmacia son efectivos en la inhibición del crecimiento de bacterias gram-positivas y exhibe utilidad como un agente antihipertensivo y como un compuesto para mejorar la utilización de la alimentación de rumiantes.

15.

20. El antibiótico de la fórmula I y sus sales aceptables en farmacia se preparan de conformidad con el invento cultivando el microorganismo *Streptomyces* sp. X-14547, del cual la clase NRRL 8167 depositada es miembro, en una solución acuosa de carbohidrato que contiene nutrientes nitrogenados y sales minerales, aislando luego el antibiótico del caldo de fermentación y, si se desea,

convirtiendo el producto obtenido en una sal respectiva aceptable en farmacia.

5. El compuesto de la fórmula I se denomina, químicamente, ácido alfa (R), 5 (S)-dimetil-6-(R)-1-etil-4-[4-(R)-(2-pirrolil-carbonil)-1-(S)-etil-3a(R),4,5(R), 7a(R)-tetrahidroindan-5-il]1(E),3(E)-butadienil tetrahidropiran-2-acético.

10. El organismo que produce el antibiótico del presente invento es una nueva especie designada Streptomyces sp. X-14547. Un cultivo del organismo viviente al que se ha asignado la denominación de laboratorio X-14547 se ha depositado en el Departamento de Agricultura de U.S.A., Agricultura Research Service, NRRL, Peoria, Illinois y se ha sumado a su colección permanente de microorganismos como NRRL 8167. El cultivo se ha identificado como una clase de Streptomyces antibioticus.

20. El nuevo microorganismo se aisló de una muestra de terreno recogida en Martinsville, Virginia. La clase representativa de Streptomyces sp. X-14547 tiene las características siguientes:

CARACTERÍSTICAS GENERALES

25. El Streptomyces X-14547 produce un micelio de substrato que no se fragmenta en esporas y un micelio aéreo que forma cadenas rectus-flexibilis de espo-

- ras; Las esporas tienen una superficie lisa. Las esporas tienen una longitud de 1,26 a 1,42 micras y un ancho de 0,69 a 0,91 micras. La pared celular contiene un isómero de ácido diaminopimélico aparte de la forma meso.
5. Este hecho, así como las características de colonia anteriores sitúan este cultivo en el género *Streptomyces*.

#### CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO

- A continuación se expone el medio ISP estándar expuesto en Shirling and Gottlieb, "Methods for Characterization of *Streptomyces* Species", *Intern. J. System. Bacteriol.*, 16, pág. 313-400, 1966, así como otros medios diversos utilizados para caracterizar el cultivo:
- 10.

15. ISP-1 a ISP-9 se describen por Shirling and Gottlieb en el artículo anterior.

Agar Czapek-Dox: caldo Czapeck-Dox (BBL) al que se adicionó agar al 1,5%.

20. Agar de Bennett: extracto de levadura, 0,1%, extracto de carne de vaca, 0,1%; N-Z amina A (hidrolizado de casina de Sheffield Inc.), 0,2%; dextrosa, 1%; agar, 1,8%; pH 7,3.

Agar Sabouraud Dextrosa: (Difco).

25. Agar *Thermoactinomyces* Fermentation: medio de fermentación Bacto *Thermoactinomyces* (Difco) al que se adicionó agar al 1,5%.

Medio ATCC 5: Agar de esporulación: extracto de levadura, 0,1%; extracto de carne de vaca, 0,1%, triptosa, 0,2%;  $\text{FeSO}_4$ , vestigios; dextrosa, 1,0%, agar, 1,5%, pH 7,2.

5. Agar Amidex : Amidex (Corn Products Co., Decatur, Ill.), 1%; N-Z Amina A, 0,2%; extracto de carne de vaca, 0,1%, extracto de levadura, 0,1%;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,0014%; agar, 2%; pH 7,3.

10. Agar de almidón/caseína; almidón soluble, 1%, caseína, 0,1%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05%;  $\text{MgSO}_4$ , 0,05%; agar, 1,5%; pH 7,4.

15. La Tabla I que sigue describe la cantidad de crecimiento, grado de esporulación, color de masa de la espora y color del micelio de substrato inverso. Las placas de agar se leyeron al cabo de 14 días de incubación a 28°C. El esquema de color utilizado fue el Color Harmony Manual, cuarta edición, 1958 (Container Corp. of America).

Tabla I: Características de cultivo de *Streptomyces* sp.

X-14547

---

Medio de agar	Cantidad de crecimiento Grado de esporulación	Color de masa de espora	Color del micelio de substrato inverso
Extracto de malta fermentada (ISP-2)	crecimiento moderado a abundante; bien esporulado; ligeramente higroscópico	3 <u>fe</u> (gris plateado) en la mayor parte; algunos penachos de <u>a</u> (blanco)	2 <u>nl</u> (pardo cubierto) en el centro; 2 <u>cg</u> (marfil claro) en el borde
Harina de avena (ISP-3)	crecimiento abundante; bien esporulado	3 <u>fe</u> (gris plateado)	3 <u>fe</u> (gris plateado) en el centro; 2 <u>dc</u> (natural) en el borde de 2 <u>dc</u> (natural)
Sales inorgánicas/almidón (ISP-4)	crecimiento abundante; bien esporulado	3 <u>fe</u> (gris plateado) con bordes y listas de <u>b</u> (blanco de ostra)	
Glicerol/asparagina (ISP-5)	crecimiento moderado; esporulación de moderada a buena; ligeramente higroscópico	2 <u>fe</u> (gris oscuro) con penachos y borde de <u>b</u> (blanco de ostra)	2 <u>ec</u> (bisquit) en la mayor parte; 2 <u>ge</u> (tostado cubierto) en el borde
Peptona/extracto de levadura/hierro (ISP-6)	crecimiento moderado; sin esporulación; pigmento soluble pardo oscuro	<u>i</u> (gris) cuando no está esporulado	<u>i</u> (gris) cuando no está esporulado
Tirosina (ISP-7)	pobre crecimiento; alguna esporulación; ligera cantidad de pigmento soluble pardo	2 <u>dc</u> (natural)	3 <u>li</u> (castor)
Agar Czapek-Dox	pobre crecimiento; a grandes trechos esporulado	<u>b</u> (blanco de ostra)	<u>b</u> (blanco de ostra)
Agar de Bennett	moderado crecimiento; bien esporulado; higroscópico	<u>fe</u> (gris cubierto)	<u>lg</u> (pardo adobe)

5.	Agar Sabou- raud Dex- trose	crecimiento mode- rado; sin esporu- lación	3 <u>ie</u> (camello) cuan- do no está esporula- do
5.	Agar Ther- moactino- myces Fer- mentación	crecimiento abun- dante; bien espo- rulado; higros- cópico	3 <u>fe</u> (gris plateado) en la mayor parte; con penachos de <u>b</u> (blanco de ostra)
10.	Medio ATCC 5 (American Type Cultu- re Collec- tion Cata- logue of Strains. 12 <sup>a</sup> Ed. 1976. Rockville, Md.)	crecimiento mode- rado; bien espo- rulado; higros- cópico	3 <u>fe</u> (gris platea- do) también áreas de 3 <u>do</u> (natural)
15.	Agar Ami- dex	crecimiento abun- dante; bien espo- rulado; ligeramen- te higroscópico	3 <u>fe</u> (gris platea- do) en la mayor parte; bordes de <u>b</u> (blanco de os- tra)
15.	Agar de almidón/ caseína	crecimiento abun- dante; bien espo- rulado; higros- cópico	3 <u>pl</u> (pardo mos- taza) en el centro; 2 <u>cb</u> (matiz marfil) entorno del borde
20.			2 <u>dc</u> (natural)

La Tabla 2 que sigue expone las características morfológicas y fisiológicas del Streptomyces sp. X-14547.

Tabla 2: características morfológicas y fisiológicas de Streptomyces sp. X-14547

	Prueba	Respuesta
	Reacción cromogénica, ISP-6	+
	Melanina, ISP-7	+ débil
5.	Superficie de espora	lisa
	Color de la masa de espora	gris
	Forma de cadena de espora	rectus-flexible
	Utilización de D-glucosa	++
	Utilización de D-xilosa	++ a +
10.	Utilización de L-arabinosa	++
	Utilización de L-ramnosa	++
	Utilización de D-fructosa	++
	Utilización de D-galactosa	++
	Utilización de Rafinosa	-
15.	Utilización de D-manitol	++
	Utilización de i-inositol	++
	Utilización de salicina	-
	Utilización de sucrosa	-
	Utilización de celulosa	-
20.	Pigmento lateral inverso	-
	Pigmento soluble	-
	Sensitividad de estreptomocina, 10 microgramos disc	+
	Reducción de nitrato	-
25.	Hidrólisis de caseína	+

Tabla 2 (Continuación)

Prueba	Respuesta
Hidrolisis de gelatina	+
5. Hidrolisis de almidón	+
Oscurecimiento ISP-1	+
NaCl (%) tolerancia	5
Gama de crecimiento de la temperatura °C	10-37
10. Isómero de ácido diamino-pimélico	Distinto del isómero meso

++ = respuesta fuertemente positiva;

va;

- = respuesta negativa.

- Según R.E. Buchanan y N.E. Buchanan y N.E. Gibbons
15. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8ª edición 1974, Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md., el cultivo X-14547 es similar al *Streptomyces antibioticus* como se conoce hasta ahora, pero cuando se compara se aprecian diferencias en la utilización de L-arabinosa, producción
20. de melanina sobre ISP-7, y reducción de nitrato. El cultivo X-14547 es todavía suficientemente similar al *Streptomyces antibioticus* tal como se conoce actualmente para justificar su identificación como una clase de *Streptomyces antibioticus*.

25. La especie X-14547 aquí descrita incluye

todas las clases de Streptomyces que forman un compuesto de la fórmula I y que no pueden diferenciarse claramente del cultivo número X-14547 y sus subcultivos incluyendo mutantes y variantes.

5. El compuesto de la fórmula I se identifica aquí y después de conocerse esta identificación resulta fácil diferenciar las razas que producen un compuesto de la fórmula I de otras.

10. El Streptomyces sp. X-14547, cuando se desarrolla bajo condiciones apropiadas produce un compuesto de la fórmula I. Un caldo de fermentación conteniendo Streptomyces sp. X-14547 se prepara inoculando esporas o micelios del organismo productor del compuesto de la fórmula I en un medio apropiado y cultivando luego bajo condiciones aeróbicas. Para la producción de un compuesto de la fórmula I es posible el cultivo sobre un medio sólido, pero para la producción en grandes cantidades se prefiere el cultivo en un medio líquido. La temperatura del cultivo puede variar sobre una amplia gama, 20°-35°C, dentro de la que puede desarrollarse el organismo, pero se prefiere una temperatura de 26°-30° y un pH sustancialmente neutro.

15. En la fermentación aeróbica sumergida del organismo para la producción de un compuesto de la fórmula I el medio puede contener como la fuente para el carbono un aceite de glicérido que se encuentra en el comercio o un carbohidrato tal como glicerol, glucosa, maltosa, lactosa, dextrina, almidón, etc. en estado puro o bruto y como la fuente de nitrógeno un material orgánico tal como soja, solubles de destiladoras, cacahuete,

20.

25.

- semillas de algodón, extracto de carne, peptona, pescado, extracto de levadura, licor de maceración de maíz, etc. y cuando se desea fuentes inorgánicas de nitrógeno tal como nitratos y sales amónicas. Las sales minerales presentes son, por ejemplo, sulfato amónico, sulfato magnésico, cloruro sódico, cloruro potásico, fosfato potásico, carbonato cálcico y vestigios de sales de metal pesado. El medio puede contener también agentes amortiguadores tal como citrato sódico o fosfatos. En los procedimientos de cultivo sumergido aireado se utiliza, de preferencia, un agente anti-espumante tal como parafina líquida, aceites grasos o compuestos de silicona. Para la producción de un compuesto de la fórmula I puede utilizarse mas de una clase de fuente de carbono, fuente de nitrógeno o fuente anti-espumante.
- 5.
- 10.
15. Después de terminada la fermentación el antibiótico X-14547 o sus sales pueden recuperarse del medio de fermentación. Esto puede llevarse a cabo siguiendo diversos métodos, por ejemplo, mediante extracción de disolvente de todo el caldo de fermentación o mediante filtración de todo el caldo y extracción de las células miceliarias con un disolvente apropiado. Los disolventes apropiados para la extracción de las células miceliarias incluyen acetona, tetrahidrofurano, sulfóxido de dimetilo o disolventes mixtos tales como cloruro de metileno-metanol o acetato de etilo-etanol.
- 20.
- 25.

de extracción de disolvente incluyen cloroformo, disolventes halogenados, tal como cloruro de metileno, disolventes etereos, acetato etílico o butílico. La cristalización final puede efectuarse utilizando, por ejemplo, acetato de etilo, acetato de butilo, cloruro de metileno o cloroformo en calidad de disolvente de cristalización.

El antibiótico 14547A forma una serie de sales aceptables en farmacia. Estas sales se preparan a partir de la forma de ácido libre del antibiótico siguiendo métodos bien conocidos en el arte; por ejemplo, lavando el ácido libre en solución con una base o sal apropiada. Ejemplos de estas sustancias básicas farmacéuticamente aceptables capaces de formar sales para los fines del presente invento incluyen bases de metal alcalino, tal como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido lítico y similares; bases de metal alcalinotérreo, tal como hidróxido cálcico, hidróxido de bario y similares; e hidróxido amónico. Las sales de metal alcalino o de metal alcalinotérreo aptas para formar sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir aniones tales carbonatos, bicarbonatos y sulfatos.

A continuación se exponen diversas características físicas del antibiótico X-14547.

En la figura 1 se representa el espectro de absorción de infrarrojos del antibiótico X-14547 en una pella de KBr. El antibiótico exhibe características de absorción en la región de infrarrojos del espectro en

En la figura la escala de la ordenada corresponde al porcentaje de transmisión y las escalas de las abscisas corresponden a la longitud de onda en micras y frecuencia ( $\text{CM}^{-1}$ ), superior e inferior respectivamente,

**POOR  
QUALITY**

las frecuencias siguientes expresado en centímetros recíprocos:

5. Picos producidos inter alia a 3140 (OH), 2470-2400 (carboxilo OH), 1735, 1710 (C=O), 1650 (C=O conjugado) y 1627  $\text{cm}^{-1}$  (C=C conjugado).

El antibiótico X-14547 exhibe una toxicidad oral ( $\text{DL}_{50}$  en el ratón de 129 mg/kg (24 horas).

10. El antibiótico X-14547 ha exhibido actividad antimicrobiana contra una variedad de bacterias y micobacterias gram-positivas, tal como se indica en la Tabla 3 que sigue.

Tabla 3

	Nombre del organismo	Colección del cultivo		Actividad antimicrobiana del antibiótico X-14547. Concentración inhibidora mínima en microgramos/cc
		Nº		
15.		ATCC	NRRL	
	Bacillus megaterium	8011		0,1
	Sarcina lutea	9341		0,1
	Bacillus species E	27859		0,2
	Bacillus subtilis		558	0,1
20.	Staphylococcus aureus	6538P		0,2
	Bacillus species TA	27860		0,2
	Mycobacterium phlei	355		3,1
	Streptomyces cellulosa	3313		0,8
	Paecilomyces varioti	26820		6,3

+ La menor dilución por dos veces dando una zona de inhibición en una prueba de difusión en vaso de agar.

5. Se ha descubierto también y debe considerarse parte del presente invento que el nuevo co-metabolito 3-etil-1,3-dihidro-3-metoxi-2H-indol-2-ona exhibe también actividad antimicrobiana contra una variedad de microorganismos, tal como se indica en la tabla 4 que sigue.

Tabla 4

10.	<u>Nombre del organismo</u>	<u>Colección del cultivo Nº</u>	<u>Concentración inhibidora mínima, microgramos/cc</u>
		ATCC	
	Escherichia coli	27856	5,0
	Pseudomonas aeruginosa	8709	5,0
	Klebsiella pneumoniae	27858	5,0
15.	Staphylococcus aureus	6538P	5,0
	Bacillus sp. TA	27860	2,5
	Paecilomyces varioti	26820	2,5

20. Según se ha indicado anteriormente, el antibiótico X-14547 y sus sales junto con su co-metabolito 3-etil-1,3-dihidro-3-metoxi-2H-indol-2-ona posee la propiedad de afectar adversamente el crecimiento de ciertas bacterias gram-positivas. Estos son útiles en soluciones de lavado para fines sanitarios como en el lavado de las manos y la limpieza de equipo, pisos o equipos de habita-

ciones o laboratorios contaminados.

5. El antibiótico X-14547 se ha descubierto que mejora también la utilización de la alimentación de rumiantes, o sea, mejora la eficacia digestiva de ciertos animales herbívoros, por ejemplo el ganado. Una discusión del mecanismo por el cual el alimento se digiere, degrada y metaboliza en un animal rumiante puede encontrarse en la patente estadounidense nº 3.839.557 que describe el empleo de ciertos antibióticos para mejorar la utilización de la alimentación de rumiantes y se incorpora aquí como referencia. Los animales rumiantes económicamente importantes son el ganado, la oveja y las cabras.

10.

15. La efectividad del antibiótico X-14547 en la modificación de la relación de ácidos grasos volátiles producidos en el omaso (y mejorando por consiguiente la utilización de la alimentación de rumiantes) se demuestra por medio de las siguientes pruebas in vitro.

20. Se obtiene fluido de omaso de un novillo con un omaso fistulado. El novillo se mantiene con la ración siguiente:

Maiz	89,93%
Alfalfa	5,000%
Aceite de soja	3,00%
25. Piedra caliza	0,80%

	NaCl	0,60%
	Fosfato dicálcico	0,50%
	Vestigios minerales	0,025%
5.	Adiciones de mezclas pre- vias de vitamina	0,1%
	Vitamina A, TUI	4,0003
	Vitamina D <sub>3</sub> , UI	0,801
	Vitamina E, TUI	3,002

10. El fluido de omaso se fuerza inmediatamente a través de un tamiz de 30 mallas.

Por cada fermentación se adicionan 75 cc del fluido resultante a un matraz de 250 cc conteniendo lo siguiente:

15. 1 g de grano finamente molido : ración de heno 80%:20%;  
1 cc de una solución acuosa de glucosa al 18%  
(1 milimol por matraz);  
1,5 cc de una solución de urea acuosa al 3,1%  
(0,76 milimol por matraz);  
20. 60 micromoles por cada uno de los 10 aminoácidos  
esenciales (arginina, histidina, leucina, metionina,  
treonina, valina, lisina, isoleucina, fenilalanina,  
triptofano);  
25. 1 cc de una solución acuosa del fármaco de prueba  
para obtener 10 o 25 microgramos/cc (volumen total  
calculado de la mezcla de fermentación de 80 cc).

- Cada matraz se incuba a  $38^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua sacudido con una cubrición de gasificación. Se hace pasar continuamente dióxido de carbono a través de la cubrición. Al cabo de cuatro horas de incubación se centrifuga una
5. cantidad de 10 cc de fluido de fermentación a 14.000 rpm (aproximadamente 30.000 g) durante 20 minutos. Se adicionan tres cc del sobrenadante a 1 cc de una solución de ácido metafosfórico conteniendo 23 micromoles de ácido 2-metil-valérico en calidad de un estándar interno.
10. El fluido resultante se deja reposar a la temperatura del ambiente durante 30 minutos. Se filtra el fluido a través de un filtro millipore de 0,22 milimicras y se refrigera hasta que la cromatografía de gas-líquido analiza los ácidos grasos volátiles.
15. Los análisis de cromatografía de gas-líquido (CGL) de cuatro fermentaciones de control in vitro y dos fermentaciones cada una con 10 y 25 ppm de antibiótico X-14547 se exponen en la tabla siguiente.
20. Relación de moles de propionato ( $\text{C}_3$ ) frente a acetato ( $\text{C}_2$ ) mas n-butirato ( $\text{nC}_4$ ) en fermentaciones de omazo in vitro.
-

Descripción (tiempo en incubación)	micromoles C <sub>3</sub> /micromoles C <sub>2</sub> + micromoles nC <sub>4</sub>	
	Fermentaciones repetidas	Medias ( $\pm 1 \sigma$ )
5. Controles (0 hrs.)	0,372 0,361 0,364 0,350	0,362 ( $\pm 0,009$ )
Controles (4 hrs.)	0,393 0,337 0,427 0,388	0,386 ( $\pm 0,037$ )
10. Antibiótico X-14547 (4 hrs.)	0,493	0,491
10 ppm $\mu\text{g/ml}$	0,489	
Antibiótico X-14547 (4 hrs.)	0,531	0,521
25 ppm	0,510	

15. Tal como se expone en la tabla anterior la relación entre propionato (C<sub>3</sub>) y acetatos y n-butilatos se mejora significativamente. Con el aumento de propionatos en lugar de acetatos a partir de carbohidratos se aumenta la eficacia del carbohidrato y por consiguiente la utilización de la alimentación.

20.

25. La administración de antibiótico X-14547 (en lo sucesivo "Antibiótico" o "Compuesto antibiótico") previene y trata la cetosis, así como mejora la utilización de la alimentación. El mecanismo causante de la cetosis es una producción deficiente de compuestos de propionato.

5. Un tratamiento actualmente recomendado es la administración de ácido propiónico o alimentos que producen, de preferencia, propionatos. Es obvio que estimulando la producción de propionato a partir de alimentos ordinarios se reducirá la incidencia de la cetosis.

10. Se ha descubierto que el antibiótico X-14547 aumenta la eficacia de la utilización de la alimentación en los animales rumiantes cuando se administra por vía oral a los animales. La forma más sencilla de administrar el antibiótico consiste en mezclarlo con el alimento de los animales.

15. Sin embargo, el antibiótico puede administrarse útilmente de otras formas. Por ejemplo, puede incorporarse a pastillas, pociones, bolos o cápsulas y dosificarse a los animales. La formulación del compuesto antibiótico en estas formas de dosificación puede llevarse a cabo siguiendo métodos bien conocidos en el arte farmacéutico veterinario.

20. Las cápsulas se producen fácilmente llenando cápsulas de gelatina con cualquier forma deseada del antibiótico deseado. Si se desea, el antibiótico puede diluirse con un diluyente en polvo inerte, tal como un azúcar, almidón o celulosa cristalina purificada con el fin de aumentar su volumen por conveniencia en el llenado de cápsulas.

25.

Las pastillas del antibiótico se obtienen siguiendo procedimientos farmacéuticos convencionales. En adición del ingrediente activo una pastilla contiene usualmente una base, un desintegrador, un absorbente, un ligante y un lubricante. Las bases típicas incluyen lactosa, azúcar en capa fina, cloruro sódico, almidón y manitol. El almidón es también un buen desintegrador como lo es el ácido algínico. En ciertas ocasiones se utilizan también agentes tensoactivos tal como lauril-sulfato sódico y sulfosuccinato dioctil-sódico. Los absorbentes comúnmente utilizados incluyen asimismo almidón y lactosa si bien el carbonato magnésico es también útil para sustancias oleosas. Los ligantes frecuentemente utilizados son la gelatina, gomas, almidón, dextrina y diversos derivados de celulosa. Entre los lubricantes comúnmente utilizados se encuentran el estearato de magnesio, talco, cera parafínica, diversos jabones metálicos y polietilenglicol.

La administración del compuesto antibiótico puede adoptar forma de un bolo de lenta liberación. Estos bolos se obtienen como las pastillas a excepción de que se proporcionan medios para retardar la disolución del antibiótico. Los bolos se preparan de modo que liberen la sustancia activa en largos períodos. La lenta disolución viene asistida eligiendo una forma altamente acuinsolu-

ble del antibiótico. Se adiciona una sustancia tal como relleno de hierro para elevar la densidad de los bolos y mantenerlos estáticos en el fondo del omaso.

5. La disolución del antibiótico se retarda mediante el empleo de una matriz de materiales insolubles en donde se embebe el fármaco. Por ejemplo, son útiles sustancias tales como ceras vegetales, ceras minerales purificadas y materiales poliméricos acuoinsolubles.

10. Las pociones del antibiótico se preparan de la forma más sencilla eligiendo una forma acuosoluble del antibiótico. Cuando por algún motivo se desea una forma insoluble puede prepararse una suspensión. Alternativamente puede formularse una poción como una solución en un disolvente fisiológicamente aceptable tal como polietilenglicol.

15. Pueden prepararse suspensiones de formas insolubles del antibiótico en productos no disolventes tal como aceites vegetales como aceite de cacahuete, maíz o sésamo, en un glicol tal como propilenglicol o un polietilenglicol; o en agua, dependiendo de la forma del antibiótico elegido.

20. Los coadyuvantes fisiológicamente aceptables apropiados son necesarios para mantener el antibiótico suspendido. Los coadyuvantes pueden elegirse entre los espesantes, tal como carboximetilcelulosa, polivinilpirro-

25.

5. lidona, gelatina y alginatos. Son muchas las clases de agentes tensoactivos para suspender el antibiótico. Por ejemplo son útiles para obtener suspensiones en productos no disolventes líquidos la lecitina, aductos de alquil-fenol/óxido de polietileno, naftalensulfonatos, alquil-bencensulfonatos y ésteres de polioxietilen-sorbitan.

10. En adición muchas sustancias que efectúan la hidrofiliidad, densidad y tensión superficial del líquido pueden asistir en la obtención de suspensiones en casos individuales. Por ejemplo, pueden ser agentes de suspensión útiles los antiespumantes de silicona, glicoles, sorbitol y azúcares.

15. El antibiótico suspendible puede ofrecerse al productor en forma de una suspensión o como una mezcla seca del antibiótico y coadyuvantes para diluirse antes del empleo.

20. El antibiótico puede administrarse también en el agua de bebida de los ruminantes. La incorporación en el agua de bebida se lleva a cabo adicionando una forma acuosoluble o suspendible en agua del antibiótico al agua en la cantidad apropiada. La formulación del antibiótico para la adición al agua de bebida sigue los mismos principios que la formulación de pociones.

25. La forma más práctica de tratar animales con el compuesto antibiótico es la de formulación del com-

puesto en el suministro alimenticio. Cualquier tipo de alimento puede medicarse con los compuestos antibióticos, incluyendo alimentos secos comunes, alimentos líquidos y alimentos en forma de pellas.

5. Los métodos para la formulación de fármacos en alimentos animales son bien conocidos. Es usual preparar una mezcla previa de fármaco concentrado como un material bruto para alimentos medicados. Por ejemplo, las mezclas previas típicas de fármaco pueden contener entre alrededor de uno a alrededor de 400 gramos de fármaco por libra de mezcla previa. La amplia gama resulta de la amplia gama de concentración del fármaco que puede desearse en el alimento final. Las mezclas previas pueden ser líquidas o sólidas.

15. Es bien entendida la formulación de alimentaciones de rumiantes que contienen las cantidades apropiadas de antibiótico para el tratamiento útil. Solo es necesario calcular la cantidad de compuesto que se desea administrar a cada animal, tener en cuenta la cantidad de alimento por día que come el animal y la concentración del compuesto antibiótico en la mezcla previa que ha de utilizarse, y calcular la concentración apropiada del compuesto antibiótico, o de la mezcla previa, en el alimento.

25. Todos los métodos de formulación, mezcla y formación de pellas con alimentos que se utilizan normal-

mente en el arte de alimentación de ruminantes son totalmente apropiados para preparar alimentos que contengan el compuesto antibiótico,

5. Según se ha expuesto, la administración oral del antibiótico altera beneficiosamente la producción de propionatos con respecto a la producción de acetatos en el omaso. Por consiguiente puede postularse que el mismo tratamiento beneficiará también animales monogástricos en los que fermenta materia vegetal fibrosa en el cecum, ya que cabe esperar que se produzca un cambio beneficioso en la relación propionato/acetato con la administración oral del presente antibiótico. Los caballos, cerdos y conejos son ejemplos de animales que digieren una parte de su alimento mediante fermentación cecal.

10. El antibiótico X-14547 exhibe también actividad en el tratamiento de hipertensión en animales de sangre caliente.

15. La actividad antihipertensiva se prueba en ratas macho Sprague Dawley (Charles River) con peso de 170-210 gramos. Se produce hipertensión DOCA-Na Mediante nefrectomía unilateral seguido de implantación subcutánea de una pella de desoxicorticosterona (DOCA) de 25 mg. Los animales se disponen en jaulas individuales recibiendo solución de cloruro sódico al 0,9% y una dieta de comida para ratas ad libitum. Se deja que transcurran dos semanas

desde la intervención quirúrgica para el desarrollo de la hipertensión, o sea, presión sanguínea sistólica, de por lo menos, 150 mm de Hg.

5. La presión sanguínea sistólica y el ritmo cardiaco se miden indirectamente a partir de la cola de ratas no anestesiadas, utilizando un transductor de impulsos neumático. Las lecturas de control se toman antes de la administración del fármaco y 1, 3, 6 y 24 horas después de su administración.

10. Los resultados se expresan como valores absolutos y cambios porcentuales a partir de los controles.

Tabla 4

		PRESION SANGUINEA SISTOLICA (mm de Hg)								
	DIA	RATA 1	RATA 2	RATA 3	RATA 4	RATA 5	RATA 6	MEDIA	CAMBIO PCT	
15.	CONTROLES PRE-FARMACO	223	203	203	199	203	209	206,7		
		10 MG/KG x 3 dias PO								
	VALORES POST-FARMACO EN (mm de Hg)									
	1	216	178	184	198	151	203	188,3	-9,0	
	2	211	201	176	168	168	190	185,7	-10,3	
	2	184	174	161	165	165	179	171,3	-17,1	
	3	214	195	193	219	198	211	205,0	-0,7	
	3	210	177	173	206	190	220	196,0	-5,2	
	4	197	172	229	212	179	228	202,8	-1,7	

Tabla 4 (Continuación)  
RITMO CARDIACO (LATIDOS/MIN.)

CONTROLES PRE-FARMACO		440	360	460	410	400	400	411,7		
10 MG/KG x 3 días PO										
5.	VALORES POST-FARMACO EN LATIDOS/MIN.	1	480	360	450	440	390	400	420,0	2,0
		2	430	320	360	490	370	430	400,0	-2,6
		2	420	310	400	310	380	450	378,3	-8,1
		3	380	360	360	360	370	350	363,3	-11,3
		3	370	360	350	360	380	370	365,0	-10,8
10.		4	370	320	360	350	340	400	356,7	-13,1

Para el empleo como un agente anti-hipertensivo; el antibiótico X-14547 se formula, utilizando materiales coadyuvantes farmacéuticos inertes convencionales, en formas de dosificación que son apropiadas para administración oral. Son posibles otras formas de dosificación, por ejemplo parenteral, pero no se prefieren. Las formas de dosificación oral incluyen, pastillas, cápsulas, gregesas, suspensiones, soluciones y similares. La identidad de los materiales coadyuvantes inertes que se utilizan para la formulación de los ingredientes activos, los compuestos activos, en formas de dosificación oral resultarán inmediatamente evidentes para los expertos en el arte. Estos materiales coadyuvantes, de naturaleza inorgánica u orgánica, incluyen, por ejemplo, gelatina, albúmina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, conservadores (estabilizadores), agentes fundentes, agentes emulsifican-

tes, sales para alterar la presión osmótica, amortiguadores, etc., que pueden incorporarse, si se desea, a dichas formulaciones.

5. Generalmente el farmaco se administra una o dos veces al día.

10. La cantidad de antibi'otico X-14547 que se encuentra presente en cualquiera de las formas de dosificación anteriormente descritas varía generalmente entre 1 y 10 mg por dosificación unitaria. La dosificación administrada a un paciente particular es variable, basada en el peso del paciente y el estado del paciente. Por consiguiente, una cantidad de dosificación efectiva de agente activo solo puede determinarse por el facultativo utilizando su mejor criterio en beneficio del paciente.

15. Los ejemplos que siguen servirán para ilustrar este invento sin que impliquen limitación del mismo.

EJEMPLO 1.

Fermentación en tanque

20. El cultivo productor del antibiótico X-14547 se desarrolla y mantiene en un medio inclinado de agar Amidex que tiene la composición siguiente (gramos/litro de agua destilada):

25.	Amidex	10,0
	N-Z amina A	2,0
	Extracto de carne de vaca	1,0

Extracto de levadura	1,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02
Agar	20,0

5. El medio inclinado se inocula con el cultivo producto del antibiótico X-14547 y se incuba a 28°C durante 7-10 días. Luego se utiliza una porción del agar conteniendo esporas y micelios del medio inclinado del cultivo esporulado para inocular un matraz Erlenmeyer de 6 litros conteniendo 2 litros de medio de inóculo esterilizado con la composición siguiente (gramos/litro de agua destilada):

Sólidos de bagazo de tomate	5,0
Solubles secos de destiladoras	5,0
Peptona OM	5,0
15. Levadura desamargada	5,0
Almidón de maíz	20,0
$\text{CaCO}_3$	1,0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (anhidro)	1,0

20. Se ajusta el pH a 7 con NaOH antes de someterlo a autoclave a 15-20 libras de presión durante 45 minutos.

El medio inoculum inoculado se incuba a 28°C durante 72 horas sobre un sacudidor giratorio, operando a 250 rpm con una carrera de 2 pulgadas.

25. Luego se utiliza una porción de cuatro litros

del cultivo resultante para inocular 60 galones en un fermentador de 100 galones con la composición siguientes (gramos/litro de agua destilada):

5.	Glucosa	10,0
	Melazas comestibles	20,0
	HySoy T	5,0
	CaCO <sub>3</sub>	2,0

10. Se ajusta el pH a 7,2 con NaOH antes de esterilización durante 1 hora y cuarto con 60 lb./pulgada<sup>2</sup> de vapor.

El medio inoculado se airea con aire comprimido esterilizado a una velocidad de 3 pies cúbicos por minuto y se agita con agitadores a 280 rpm. La fermentación se lleva a cabo a 28°C durante 4-6 días.

15. EJEMPLO 2.

Aislamiento del antibiótico X-14547 y co-metabólitos de 3-etil-1,3-dihidro-3-metoxi-2H-indol-2-ona y ácido pirrol-2-carboxílico

20. Etapa A. Al conjunto de caldo de una fermentación de 100 galones (380 litros) tal como se ha expuesto en el ejemplo 1, se adicionó, después de un crecimiento de 4-6 días, un volumen igual de acetato de etilo. Después de agitarse durante una hora la fase disolvente se separó y se concentró hasta 2 litros bajo presión reducida. Se lavó 25. el extracto de disolvente concentrado con volúmenes iguales

de HCl 1N por tres veces. Se secó el disolvente sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró hasta formar un aceite bajo presión reducida. Se disolvió el aceite en éter dietílico y se separó por filtración cristales de ácido pirrol-2-carboxílico brutos. La recristalización en etanol/éter dió la muestra analítica del compuesto anterior: punto de fusión 202-203°C.

5.

Microanálisis: Calculado para  $\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}_2$  (111,10):  
%C, 54,06; %H, 4,54; %N, 12,60.

10.

Hallado: %C, 54,33; %H, 4,65; %N, 12,60.

Etapa B. El licor madre se concentró hasta formar un aceite bajo presión reducida, se redisolvió en 250 cc de acetonitrilo y se lavó por dos veces con volúmenes iguales de n-hexano. Se combinaron las lavazas de n-hexano y se extrajeron con 1/2 volumen de metanol. El extracto metanólico se combinó con el acetonitrilo y se separó el disolvente bajo presión reducida. Se disolvió el sólido oleoso en acetonitrilo y después de enfriarse hasta aproximadamente 3°C durante una noche se recuperó el antibiótico X-14547 cristalino mediante filtración en forma de un hemihidrato, punto de fusión 137°C,  $[\alpha]_D^{25} -285^\circ$  (C, 1 en  $\text{CHCl}_3$ ).

15.

20.

Microanálisis: Calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_{0,5}$  (502,70):  
%C, 74,07; %H, 8,82; %N, 2,78  
%O, 14,32.

25.

Hallado: %C, 74,36; %H, 8,93; %N,  
2,50; %O, 13,81.

5. Etapa C. El licor madre de acetonitrilo se concentró hasta formar un sólido oleoso y se sometió a cromatografía en una columna empaquetadora con 600 g de gel de sílice (calidad Davison 62) en suspensión de n-hexano. Se eluyó la columna con 250 cc de n-hexano y luego un gradiente entre 1 litro de acetato de etilo al 2% en n-hexano y 1 litro de acetato de etilo en n-hexano (3:1) y luego 500 cc de acetato de etilo. Se recogieron fracciones de 6 cc cada una y de las fracciones números 100 a 200, después de separarse el disolvente bajo presión reducida, se recuperó antibiótico X-14547 adicional. De las fracciones 201 a 290, después de concentración y cristalización en acetónitrilo, se recuperó 3-etil-1,3-dihidro-3-metoxi-2H-indol-2-ona, punto de fusión 179°C.
- 10.
- 15.

Microanálisis: Calculado para  $C_{11}H_{13}NO_2$  (191,23):  
%C, 69,09; %H, 6,85; %N, 7,33.  
Hallado: %C, 69,02; %H, 6,96; %N, 7,19.

20.

### EJEMPLO 3.

#### Fermentación en tanque

- El cultivo productor del antibiótico X-14547 se desarrolla y mantiene en un medio inclinado de agar Amidex tal como se ha descrito en el ejemplo 1 o en un medio de agar de almidón-caseína con la composición si-
- 25.

guiente (gramos/litro de agua destilada):

	Almidón soluble	10,0
	Caseína	1,0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	0,5
5.	MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	0,5
	Agar	20,0

Se ajusta el pH a 7,4 con NaOH antes de someterse a autoclave a 15-20 libras por pulgada cuadrada durante veinte minutos.

10. Se inocula el medio inclinado con cultivo productor del antibiótico X-14547 (*Streptomyces* sp. X-14547) y se incuba a 28°C durante 7-10 días. Luego se utiliza una porción del agar del cultivo esporulado para preparar inoculum vegetativo inoculando un matraz de Erlenmeyer de 6 litros conteniendo 2 litros de medio de inoculum esterilizado con la composición siguiente (gramos/litro de agua destilada):

	Sólidos de bagazo de tomate	5,0
	Solubles secos de destiladora	5,0
20.	Peptona OM	5,0
	Levadura desamargada	5,0
	Almidón de maíz	20,0
	CaCO <sub>3</sub>	1,0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	1,0

25. El pH se ajusta a 7,0 antes de someterse a

autoclave a 15-20 libras por pulgada cuadrada durante cuarenta y cinco minutos.

5. El medio inoculum inoculado se incuba durante 72 horas a 28°C en un sacudidor giratorio operando a 250 rpm con una carrera de 2 pulgadas.

Se utiliza cuatro litros de este cultivo para inocular 60 galones del medio siguiente en un fermentador de 100 galones (gramos/litro de agua del grifo):

	Sólidos de bagazo de tomate	5,0
10.	Solubles secos de destiladora	5,0
	Peptona OM	5,0
	Levadura desamargada	5,0
	Almidón de maíz	20,0
	CaCO <sub>3</sub>	1,0
15.	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	1,0
	Antiespumante Sag 4130	0,1
	(Union Carbide)	

20. Se ajusta el pH del medio a 7,0 con NaOH antes de esterilización durante 1 hora y 1/4 con vapor a 60 libras por pulgada cuadrada.

Se airea el medio inoculado con aire comprimido a una velocidad de 3 pies cúbicos por minutos y se agita con agitadores a 280 rpm. La fermentación se lleva a cabo a 28°C durante 43 horas.

25. Se utilizan cinco galones de este cultivo

para inocular 350 galones del medio siguiente en un tanque de 1000 galones (gramos/litro de agua del grifo):

	Sólidos de bagazo de tomate	5,0
	Solubles secos de destiladora	5,0
5.	Peptona OM	5,0
	Levadura desamargada	5,0
	Almidón de maíz	20,0
	CaCO <sub>3</sub>	1,0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	1,0
10.	Antiespumante Sag 4130 (Unión Carbide)	0,1

El pH del medio se ajusta a 7,0 con NaOH antes de esterilización durante 1 hora y 1/4 con 60 libras por pulgada cuadrada de vapor.

15. Se airea el medio inoculado con aire comprimido a una velocidad de 3 pies cúbicos por minuto y se agita con agitadores a 280 rpm. La fermentación se lleva a cabo a 28°C durante 118 horas.

EJEMPLO 4.

20. Aislamiento del antibiótico X-14547 y co-metabolitos de 3-etil-1,3-dihidro-3-metoxi-2H-indol-2-ona y ácido pirrol-2-carboxílico

25. Etapa A. Al conjunto del caldo a partir de una fermentación de 350 galones (1350 litros), tal como se ha expuesto en el ejemplo 2, se adicionó, después de 118 horas de crecimiento, un volumen igual de acetato de etilo. Después de

5. agitarse durante una hora se separó la fase disolvente y se concentró hasta 7,25 litros bajo presión reducida. Se lavó el extracto disolvente concentrado con 3 litros de HCl 1N por tres veces. Se secó el disolvente sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró hasta obtener un aceite bajo presión reducida. Se disolvió el aceite en éter dietílico y se separaron mediante filtración cristales de ácido pirrol-2-carboxílico bruto. La recristalización en etanol/éter dió la muestra analítica del compuesto anterior: punto de fusión 202-203°C.

10. Microanálisis: Calculado para  $\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}_2$  (111,10):  
%C, 54,06; %H, 4,54; %N, 12,60.  
Hallado: %C, 54,33; %H, 4,65; %N, 12,60.

15. Etapa B. Se concentró el licor madre hasta obtener un aceite bajo presión reducida, se redisolvió en 1 litro de acetonitrilo y se lavó por dos veces con volúmenes iguales de n-hexano. Se combinaron las lavazas de n-hexano y se extrajeron con 1/2 volumen de metanol. Se combinó el extracto metanólico con el acetonitrilo y se separó el disolvente bajo presión reducida. Se disolvió el sólido oleoso en acetonitrilo y después de enfriarse hasta aproximadamente 3°C durante una noche se recuperó, mediante filtración, el antibiótico X-14547 cristalino, en forma de un hemihidrato, punto de fusión 137°C,  $[\alpha]_D^{25} -285^{\circ}$

20. (C, 1 en  $\text{CHCl}_3$ ).

25.

Microanálisis: Calculado para  $C_{31}H_{43}NO_4 \cdot (H_2O)_{0,5}$  (502,70):

%C, 74,07; %H, 8,82; %N, 2,78;

%O, 14,32.

Hallado: %C, 74,36; %H, 8,93; %N, 2,50;

%O, 13,81.

5.

Etapa C. Se concentró el licor madre de acetonitrilo hasta obtener un sólido oleoso y se sometió a cromatografía en una columna empaquetada con 600 g de gel de sílice (calidad Davison 62) suspendido en n-hexano. Se eluyó la columna con 1 litro de n-hexano y luego un gradiente entre 4 litros de acetato de etilo al 2% en n-hexano y 4 litros de acetato de etilo n-hexano (3:1) y luego 2 litros de acetato de etilo. Se recogieron fracciones de veinticinco cc cada una y de los números de fracción 100 a 200, después de separarse el disolvente bajo presión reducida, se recuperó antibiótico X-14547 adicional.

10.

15.

De las fracciones 201 a 290, después de concentración y cristalización en acetonitrilo se recuperó 3-etil-1,3-dihidro-3-metoxi-2H-indol-2-ona, punto de fusión 179°C.

20.

Microanálisis: Calculado para  $C_{11}H_{13}NO_2$  (191,23):

%C, 69,09; %H, 6,85; %N, 7,33.

Hallado: %C, 69,02; %H, 6,96; %N, 7,19.

#### EJEMPLO 5.

#### Aislamiento de la sal sódica del antibiótico X-14547

25.

La totalidad del caldo de otra prueba de fer-

- mentación se extrajo con una mitad del volumen de cloroformo. Se separó la fase disolvente y se concentró bajo presión reducida hasta 2,35 litros y se lavó sucesivamente con volúmenes iguales de HCl 1N, NaOH 1N y agua.
5. Se secó el disolvente bajo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró hasta formar un aceite. Se redisolvió el aceite 2 litros de acetonitrilo y se lavó con 2 litros de n-hexano. Se concentró el acetonitrilo hasta formar un aceite y se filtró a través de 970 gramos de gel de sílice con 4 litros de cloruro de metileno y luego 8 litros de cloruro de metileno-acetona (1:1). La fracción biológicamente activa se cromatografió en una columna empaquetada con gel de sílice (cloruro de metileno) de 300 gramos en suspensión y se eluyó con un gradiente entre 7 litros de cloruro de metileno y 7 litros de cloruro de metileno-éter dietílico-etanol (48:48:14). Se combinaron las fracciones número 290-460 (veinticinco cc cada una) y se concentraron hasta formar un aceite. Se disolvió el aceite en una pequeña cantidad de acetonitrilo y con la adición de
10. n-hexano se recuperó la sal sódica del antibiótico X-14547 mediante filtración en forma de un polvo blanco conteniendo 1 mol de n-hexano por mol del compuesto.
- 15.
- 20.

25. Calculado  $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N NaO}_4 \cdot \text{C}_6\text{H}_{14}$  (599,83):  
%C, 74,09; %H, 9,08; %N, 2,34; %Na 3,83.  
Hallado: %C, 74,00; %H, 8,86; %N, 2,10; %Na, 4,04.

EJEMPLO 6

Preparación de sales de antibiótico X-14547

A. Preparación de la sal mono-N-metil-glucamínica del antibiótico X-14547

5. Se adicionó una solución de 0,986 g de la forma de ácido libre del antibiótico X-14547 en cloruro de metileno-metanol (1:1) a una solución de 0,395 g (2 mm) de N-metilglucamina en metanol-agua (3:1). Se concentró la solución bajo presión reducida hasta un polvo que se cristalizó con la adición de n-hexano-etanol. El hidrato de la sal N-metil-glucamínica del antibiótico X-14547 cristalino obtenido mostró un punto de fusión de 109-111°C.

10. B. Preparación de la sal di-N-metilglucamínica del antibiótico X-14547

15. Se adicionó una solución de 1,972 g (4mm) de la forma ácida libre del antibiótico X-14547 en cloruro de metileno a una solución de 1,580 g (8mm) de N-metilglucamina en metanol-agua (2:1). Se concentró la solución bajo presión reducida hasta un polvo, y se cristalizó en n-hexano-etanol. El hidrato de la sal di-N-metilglucamínica del antibiótico X-14547 cristalino obtenido mostró un punto de fusión de 80-120°C.

20. C. Preparación de la sal cálcica del antibiótico X-14547

25. Se lavó una solución de 0,50 g (1 mm) de la forma ácida libre del antibiótico X-14547 en acetato de etilo con

5. 3 mmol de una solución acuosa de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Se separó la solución y se concentró bajo presión reducida hasta un polvo que se cristalizó en acetona-acetonitrilo. El hemihidrato de la sal cálcica del antibiótico X-14547 cristalino obtenido mostró un punto de fusión de  $179^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{25} -401^\circ$  (1%,  $\text{CHCl}_3$ ).

#### EJEMPLO 7

Preparación de la sal R-(+)-1-amino-1-(4-bromofenil)-etánica del antibiótico X-14547

10. Se adicionó una solución de 493 mg (1 mmol) del antibiótico X-14547 en cloruro de metileno a una solución de 181 mg de R-(+)-1-amino-1-(4-bromofenil)-etano en cloruro de metileno. Después de la adición de n-hexano y lenta evaporación del disolvente se recuperó el producto  
15. final cristalino. La recristalización en cloruro de metileno/n-hexano dió cristales apropiados para el análisis a los rayos X, punto de fusión  $128-131^\circ\text{C}$ .

Calculado  $\text{C}_{70}\text{H}_{96}\text{BrN}_3\text{O}_8$  (1187,46):

%C, 70,70; %H, 8,15;

%N, 3,54; %Br, 6,73.

20.

Hallado: %C, 70,96; %H, 8,30; %N 3,68; %Br, 6,83.

25. La sal cristalina contuvo dos moléculas de antibiótico X-14547 por una molécula de la amina, explicándose así la fórmula utilizada para calcular el microanálisis (análogo al antibiótico X-14547 hemihidrato del ejem-

plo 3).

EJEMPLO 8

Un ejemplo de una formulación para pastillas es como sigue:

5. Formulación para pastillas

	<u>Por pastilla</u>
Antibiótico X-14547	1,0 mg
Lactosa anhidra	137,0 mg
Almidón de maíz	20,0 mg
10. Celulosa microcristalina	40,0 mg
Estearato de magnesio	<u>2,0 mg</u>
	200 mg

15. Se mezcló previamente el fármaco con una parte de la lactosa en una mezcladora apropiada y a continuación se molturó. La mezcla se combinó adicionalmente con el almidón de maíz, la lactosa restante y la celulosa durante 15 minutos y a continuación se molió. Seguidamente se combinó la mezcla con el estearato de magnesio durante dos minutos. Se comprimieron las pastillas para formar 20. una pastilla con un peso de 200 mg utilizando punzones para pastillas con un diámetro de aproximadamente 1/4 de pulgada. Las pastillas pueden ser planas o biconvexas y si se desea pueden practicarse las hendiduras.

EJEMPLO 9

25. Un alimento para animal para utilizarse de con-

formidad con el invento:

	As Is, % en peso	Báse de materia seca, % en peso
	<u>21,6</u>	<u>10,7</u>
5. Maíz de silo		
Maíz triturado en seco	70,7	80,0
Suplemento proteínico	7,7	9,3
<u>Suplemento proteínico</u>		
		15,49
		3,72
10. Semilla de algodón		63,56
Piedra caliza		8,97
Sal (NaCl)		3,40
Vestigios minerales		0,11
Premezcla de vitamina A		0,13
15. KCl		4,36
Premezcla de X-14547 (14% en peso)		<u>0,26</u>
		100,00
<u>Premezcla de X-14547</u>		
		15
20. Cáscara de arroz		85

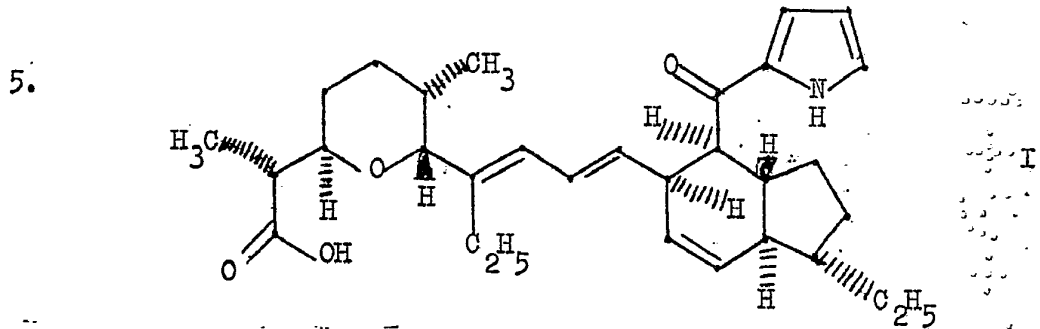
= . =

REIVINDICACIONES

25. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente en

U.S.A. nº 712.286 del 6 de Agosto de 1976.

1. Procedimiento para la preparación de una nueva sustancia antibiótica, de la fórmula



10. y sus sales aceptables en farmacia, caracterizado porque comprende cultivar *Streptomyces* sp. X-14547, del que la raza NRRL 8167 es un miembro, en una solución acuosa de carbohidrato conteniendo nutrientes nitrogenados y sales minerales, aislar a continuación el antibiótico del caldo de fermentación y, si se desea, convertir el producto obtenido en una sal aceptable en farmacia respectiva.
- 15.

2. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la raza de *Streptomyces* sp. X-14547 utilizada es NRRL 8167.

20. 3. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el cultivo de *Streptomyces* sp. C-14547 se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas sumergidas.

25. 4. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el

6

cultivo de *Streptomyces* sp. X-14547 se lleva a cabo en presencia de un agente antiespumante.

5. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el cultivo de *Streptomyces* sp. X-14547 se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 20° y 35°C a pH sustancialmente neutro.

10. 6. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el aislamiento del antibiótico de la fórmula I se lleva a cabo extrayendo el caldo de fermentación con acetato de etilo, separando el disolvente del extracto, lavando el residuo con ácido clorhídrico acuoso y extrayéndolo con éter dietílico, separando el disolvente del extracto disolviendo el residuo en acetonitrilo, lavando la solución de acetonitrilo con n-hexano, extrayendo las lavazas de n-hexano con metanol, combinando las soluciones de acetonitrilo y metanol y separando el disolvente de éstas para obtener antibiótico de la fórmula I puro después de la recristalización en acetonitrilo.

15.

20.

7. Procedimiento para la preparación de una nueva sustancia antibiótica.

25. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 44 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

24

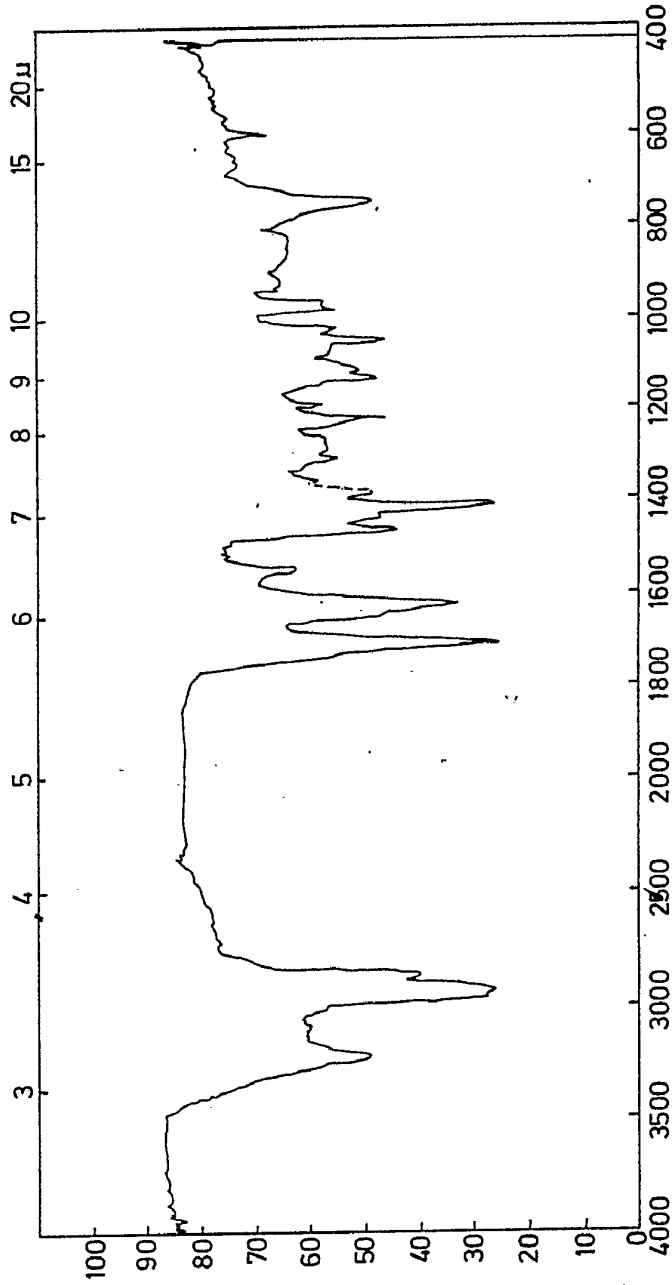
Madrid, a 5 Agosto 1976

p.a.

p. p. JAIME ISERN

Firmado: JOSE F. NIETO

*CB*

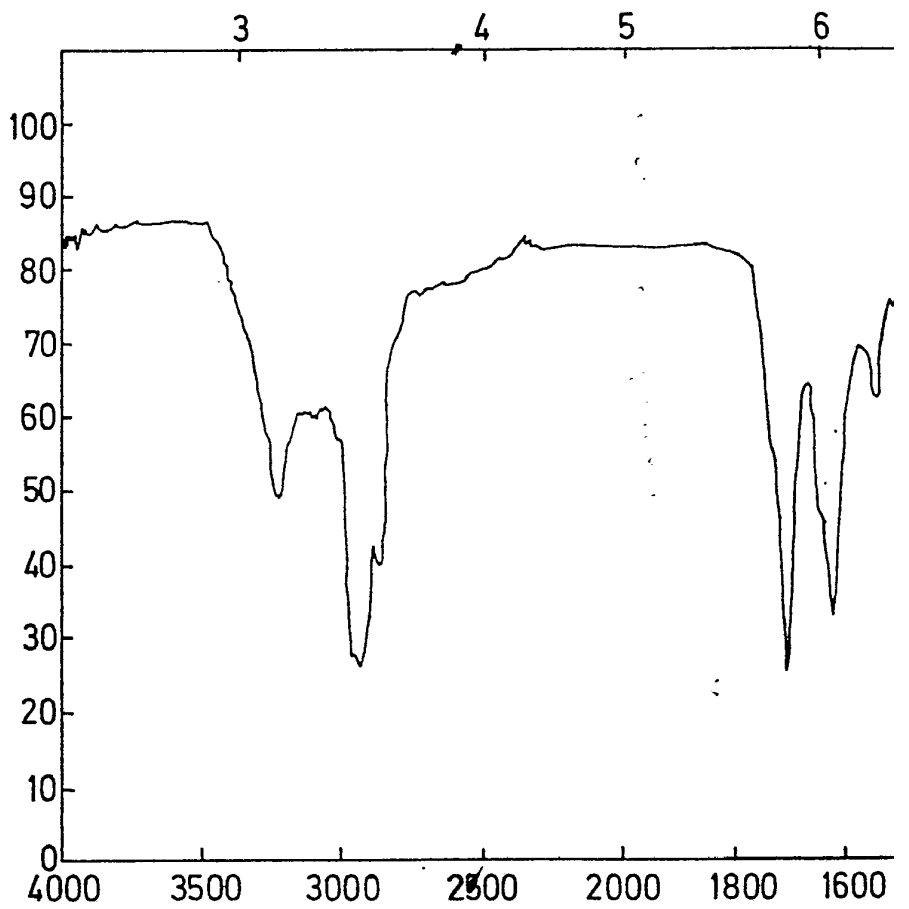


MADRID a 5 AGO. 1977  
P.A.

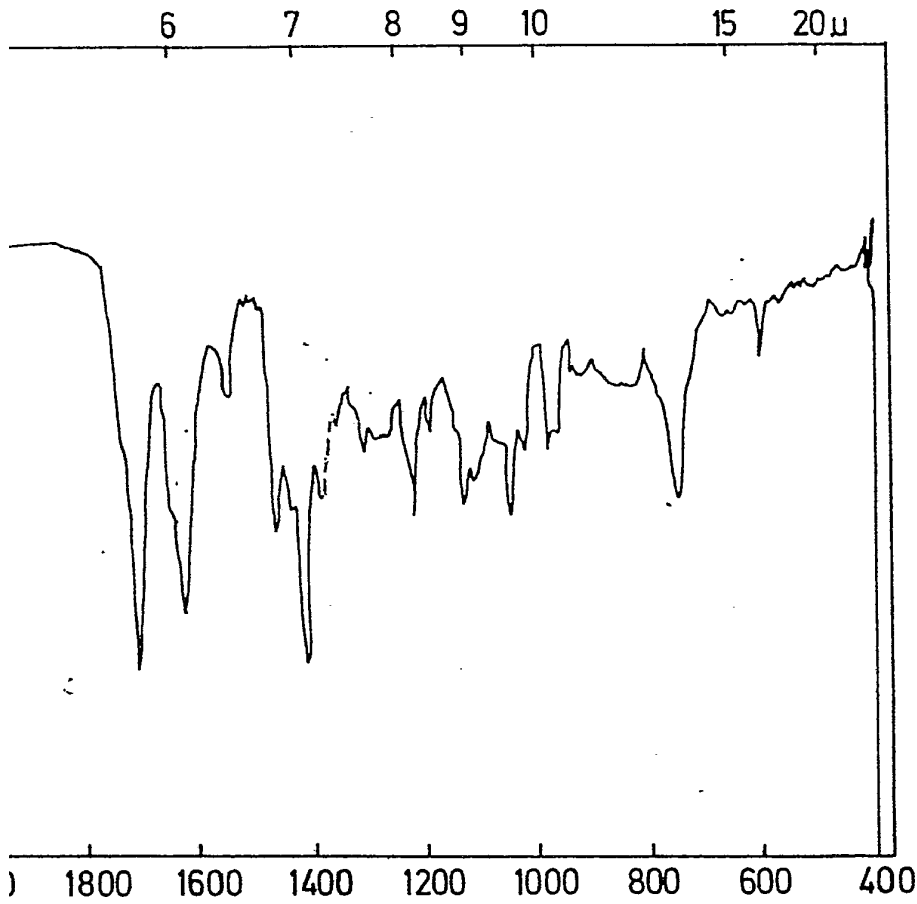
J. JAIME ISERN  
P. P.

Enviado: JOSE F. NIETO

F. HOFFMANN - LA ROCHE & Cie.S.A.



ESCALA VARIABLE.



MADRID a  
P. A.

5 AGO. 1977

JAIME ISERN  
p. p.

Firmado: JOSE F. NIETO