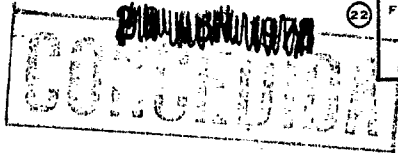


MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



PATENTE DE INVENCION

(10) ES	(11) NUMERO 463.207	(19) A1
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION 14-10-77	

Concedido el Registro de acuerdo con lo que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.
20/10/77

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO 37166/77 811.448	31-3-77 29-6-77	Japón EE.UU.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL e12D	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(54) TITULO DE LA INVENCION
"UN METODO PARA PRODUCIR EL ANTIBIOTICO C-15003".

(71) SOLICITANTE (S) (Case F-2318A)
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
27, Doshomachi, 2-chome, Higashi-ku, Osaka, Japón

(72) INVENTOR (ES)
Eiji Higashide, Mitsuko Asai y Seiichi Tanida

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE (P.- 67.008)
DCN ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ

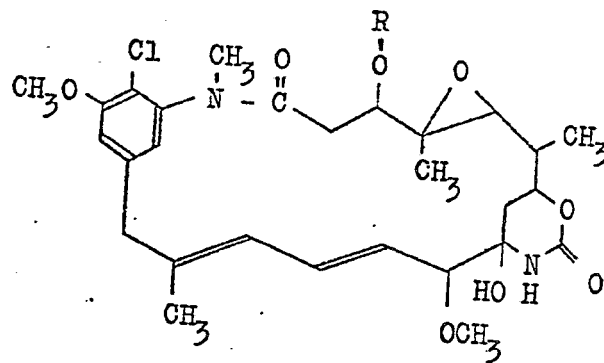
lfg

1 La presente invención se refiere al antibiótico ---
C-15003, que es un antibiótico nuevo, a un método para pro-
ducirlo y a un método para producir derivados de dicho an-
tibiótico.

5 Los autores de la presente invención han recogido mu-
chas muestras de terreno y otras, y han realizado una se-
lección de los microorganismos aislados de tales muestras.
Por dicha selección se halló que algunos de los microorga-
nismos eran capaces de producir un antibiótico nuevo, que
10 tales microorganismos pertenecían al género Nocardia, y --
que cultivando cualquiera de esos microorganismos en un me-
dio adecuado se podía hacer que dicho antibiótico se acumu-
lase en el caldo de cultivo. También se halló que se po-
dían obtener derivados de dicho antibiótico. Siguieron --
15 nuevos estudios, que tuvieron como resultado el desarrollo
de la presente invención.

Por tanto, la presente invención se refiere:

(1) Antibiótico C-15003, que tiene la fórmula general
(I):



1

(donde R representa $-\text{CO}-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ o

5

$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$);

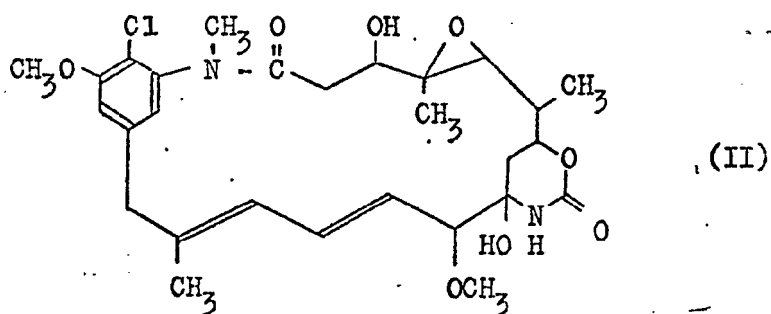
10

(2) Un método para producir antibiótico C-15003, caracterizado porque dicho método comprende cultivar una cepa del género Nocardia productora de antibiótico C-15003, en un medio que haga que la cepa elabore y acumule antibiótico C-15003 en el caldo de cultivo, y recuperar dicho antibiótico C-15003 de dicho caldo; y

15

(3) Un método para producir un compuesto de fórmula (II):

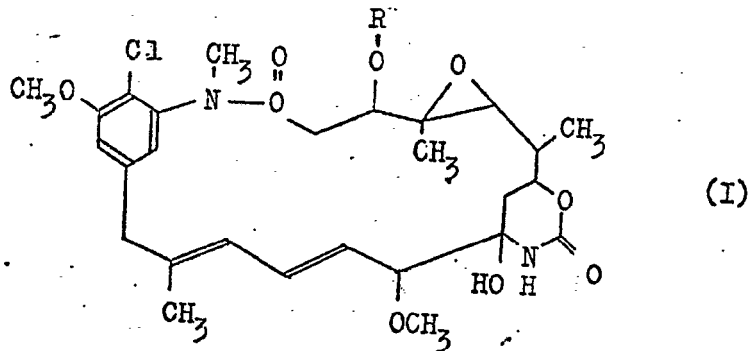
20



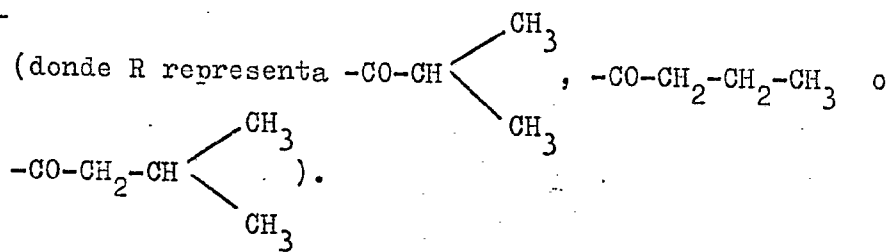
25

caracterizado porque dicho método comprende hidrolizar un antibiótico C-15003 de fórmula general (I):

30



1



5

10

En el contexto de la presente invención, el término "antibiótico C-15003" significa, genéricamente, los tres compuestos que tienen la anterior fórmula general (I) como grupo, o una mezcla de dos o tres de dichos compuestos, o individualmente cualquiera de los mismos compuestos. Haciendo referencia también a la fórmula general (I), el com

15

puesto en el que R es $-\text{CO}-\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$ se denomina aquí "antibiótico C-15003 P-3", o más abreviadamente "C-15003 P-3"; el compuesto en el que R es $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ se denomina aquí "antibiótico C-15003 P-3'", o más abreviadamente "C-15003 P-3'"; el compuesto en el que R es - - - - -

20

$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$ se denomina aquí "antibiótico C-15003 P-4", o más abreviadamente "C-15003 P-4"; y el compuesto en el que R es H (fórmula general (II)) se denomina aquí "antibiótico C-15003 P-0", o más abreviadamente "C-15003 P-0".

25

30

Como ejemplo de la cepa de microorganismo productora de antibiótico C-15003, se puede mencionar una cepa de actinomicetos nº C-15003, que los autores de la presente invención aislaron del terreno y otras muestras, en su selección de microorganismos productores de antibióticos.

1 Los caracteres microbiológicos de la cepa nº C-15003
se investigaron por métodos análogos a los propuestos por
Schirling & Gottlieb (International Journal of Systematic
Bacteriology 16, 313-340 (1966)). Los resultados de las -
5 observaciones a 28°C durante 21 días son como sigue.

1) Caracteres morfológicos

El micelio vegetativo se extiende bien y se desarro--
lla en ramas, tanto en agar como en medio líquido. Muchas
de las hifas miden 0,8 a 1,2 μ m de diámetro, y en ciertos
10 casos se pueden dividir en fragmentos que se parecen a bacte-
rias en bastoncillo o longitudes cortas de hifas ramifi-
cadas. La cepa de buen crecimiento en diversos medios ta-
xonómicos, estando el micelio aéreo superpuesto sobre el -
micelio vegetativo, aunque frecuentemente forma cuerpos --
15 tipo coremia (50-200 x 200-1000 μ m) sobre los que tienen
lugar más crecimiento aéreo. Muchos de los micelios aéreos
están flexionados, encontrándose en pocas ocasiones la con-
figuración rectilínea o espiral floja. El examen microscó-
pico de cultivos envejecidos revela que solo en pocos ca--
20 sos se presentan en las cadenas células tipo conidio, mien-
tras que las suspensiones de células obtenidas de las su--
perficies de tales cultivos, según se examinan microscópi-
camente, contenían muchos cuerpos elipsoidales alargados -
25 (0,8-1,2 μ m x 4,8-6,8 μ m) y elipsoidales (0,8-1,2 x
x 1,0-2,0 μ m) que se parecen a artrosporas.

Los exámenes al microscopio electrónico mostraron que
estos cuerpos tenían superficies lisas.

2) Constituyentes de las células

La cepa se cultivó con sacudidas en medio ISP nº 1 mo-
30 dificado, a 28°C durante 66 a 90 horas, al final del cual

1 - tiempo las células se recogieron y se aclararon. Por el
método de B. Becker y otros (Applied Microbiology 12, 421
(1964)) y el método de M.P. Lechevalier (Journal of Labo-
5 ratory and Clinical Medicine 71, 934 (1968)), las células
enteras anteriores se examinaron para determinar al ácido
diaminopimélico y la composición de azúcar. Se halló que
el primero estaba en forma meso, mientras que se detecta-
ron manchas que correspondían a galactosa y arabinosa.

3) Características en medios taxonómicos

10 La cepa mostró un crecimiento relativamente bueno en
diversos medios, siendo el micelio vegetativo de incoloro
a amarillo claro en las fases iniciales de cultivo, y de
canela amarillento claro a canela amarillento en fases pos-
teriores. La cepa produce pigmentos solubles, de amarillo
15 a canela amarillento, en diversos medios taxonómicos. El
micelio aéreo es pulverulento, y en general da un creci-
miento moderado, siendo blanco a amarillo o canela amari-
llento claro. Las características de la cepa en diversos
medios taxonómicos se exponen en la Tabla 1.

20 Tabla 1 - Características de cultivo de la cepa nº
C-15003 en medios taxonómicos

(A) Agar de sacarosa nitrato:

25 Crecimiento (C): moderado, amarillo melón brillante
(3 ia)[‡] a canela ámbar (3 lc)[‡], se
formaron cuerpos tipo coremia

Micelio aéreo (MA): escaso, blanco

Pigmento soluble (PS): ninguno, o canela amarillento
claro

30

- 1 (B) Agar de glicerina nitrato:
C: moderado, marfil claro (2 ca)[ⓧ], se formaron cuerpos tipo coremia
MA: moderado, blanco
5 PS: ninguno
- (C) Agar de glucosa asparagina:
C: moderado, caléndula brillante (3 pa)[ⓧ] a amarillo brillante (2 pa)[ⓧ]
MA: escaso, blanco
10 PS: amarillo brillante (2 pa)[ⓧ]
- (D) Agar de glicerina asparagina
C: moderado, marfil claro (2 ca)[ⓧ], se formaron cuerpos tipo coremia
MA: escaso, blanco
15 PS: ninguno
- (E) Agar de almidón:
C: moderado, marfil claro (2 ca)[ⓧ] a trigo claro - - (2 ea)[ⓧ], se formaron cuerpos tipo coremia
MA: abundante, marfil claro (2 ca)[ⓧ]
20 PS: ninguno
- (F) Agar nutriente:
C: moderado, marfil claro (2 ca)[ⓧ] a amarillo colonial (2 ga)[ⓧ], se formaron cuerpos tipo coremia
MA: escaso, blanco
25 PS: ninguno
- (G) Agar de malato cálcico
C: moderado, marfil claro (2 ca)[ⓧ] a trigo claro - - (2 ea)[ⓧ], se formaron cuerpos tipo coremia
MA: moderado, blanco a marfil claro (2 ca)[ⓧ]
30 PS: ninguno

- 1 (H) Agar de extracto de levadura-extracto de malta
C: moderado, ámbar (3 lc)[Ⓢ] a amarillo brillante - -
(3 la)[Ⓢ], se formaron cuerpos tipo coremia
MA: moderado, blanco a marfil claro (2 ca)[Ⓢ]
5 PS: ninguno
- (I) Agar de harina de avena
C: moderado, marfil claro (2 ca)[Ⓢ] a amarillo colonial
(2 ga)[Ⓢ], se formaron cuerpos tipo coremia
MA: escaso, blanco a amarillo claro
10 PS: ninguno
- (J) Agar de peptona extracto de levadura hierro
C: moderado, amarillo colonial (2 ga)[Ⓢ]
MA: nada
PS: amarillo colonial (2 ga)[Ⓢ]
- 15 (K) Agar de tirosina
C: moderado, marfil claro (2 ca)[Ⓢ] a amarillo melón -
claro (3 ea)[Ⓢ], se formaron cuerpos tipo coremia
MA: moderado, blanco a marfil claro (2 ca)[Ⓢ]
PS: camello (3 ie)[Ⓢ]

20 [Ⓢ]Códigos de color según el Color Harmony Manual (Manual de armonía de colores), 4ª ed. (Container Corporation of --- America, 1958).

4) Caracteres fisiológicos

25 Los caracteres fisiológicos de la cepa se muestran -
en la Tabla 2. Intervalo de temperatura para el crecimien
to: 12°C a 38°C. El intervalo de temperatura en el que -
tiene lugar buen crecimiento aéreo en agar (ISP nº 2) es
20 a 35°C.

1	<p>Tabla 2 - Caracteres fisiológicos de la cepa nº C-15003</p>
	Intervalo de temperatura para el crecimiento: 12 a 38°C
	Intervalo de temperatura para crecimiento aéreo: 20 a 35°C
5	Licuación de gelatina: positivo
	Hidrólisis de almidón: positivo
	Reducción de nitratos: positivo
	Peptonización de leche: positivo
	Coagulación de leche: negativo
10	Descomposición de caseína: positivo
	Producción de pigmentos melanoides:
	negativo (agar de peptona extracto de levadura hierro)
	positivo (agar de tirosina)
	Descomposición de tirosina: positivo
15	Descomposición de xantina: negativo
	Descomposición de hipoxantina: negativo
	Tolerancia de lisozima: positivo
	Tolerancia a cloruro sódico: 2%
	5) Utilización de diversas fuentes de carbono
20	La utilización de diversas fuentes de carbono se in-
	vestigó usando un medio descrito en Pridham y Gottlieb - -
	(Journal of Bacteriology <u>56</u> , 107 (1948)) y un medio basal
	de la misma composición más 0,1% de extracto de levadura.
	El espectro resultante se muestra en la Tabla 3.

25

30

1 Wilkins Co., 1961); R.E. Buchanan y N.E. Gibbons: "Bergey's
Manual of Determinative Bacteriology" (Manual Bergey de --
bacteriología determinativa), 8ª ed., 1974; y otra biblio-
grafía.

5 Aunque se creyó que esta cepa pertenecía al Grupo III
del género Nocardia, el fracaso para encontrar cualquier --
especie que tuviese los caracteres hasta ahora descritos,
entre las cepas conocidas, condujo a la conclusión de que
esta cepa representaba una especie nueva de microorganis--
10 mo.

La presente cepa nº C-15003 se ha depositado en el --
Fermentation Research Institute (Instituto de investigacio-
nes sobre fermentación), Agency of Industrial Science and
Technology (Agencia de ciencia y tecnología industrial) --
15 (FERM), bajo el número de recibo 3992; en el Institute for
Fermentation (Instituto de fermentación), Osaka (IFO), ba-
jo el número de acceso IFO 13726; y en la American Type --
Culture Collection (Colección americana de cultivos tipo)
(ATCC), Maryland, EE.UU., bajo el número de acceso 31281.

20 Aunque la cepa nº C-15003 es una especie nueva del --
género Nocardia, según se acaba de mencionar, es suscepti-
ble, como lo son los microorganismos en general, de experi-
mentar variaciones y mutaciones, ya sea espontáneamente o
bajo la influencia de un mutágeno. Por ejemplo, no se de-
25 be considerar que las muchas variantes de la cepa que se --
pueden obtener por irradiación con rayos X, rayos gamma, --
luz ultravioleta, etc, por aislamiento de monocélulas, por
cultivo en medios que contengan diversos productos quími--
cos, o por cualquier otro tratamiento mutágeno, así como --
30 los mutantes espontáneamente derivados de la cepa, repre--

1 -sentan cualquier otra especie distinta, sino que, en vez
de ello, cualquiera de tales variantes y mutantes capaces
de eleborar C-15003 P-3, P-3' y/o P-4 se puede utilizar -
invariablemente para los fines de la presente invención.
5 A título de ejemplo, la sumisión de la cepa n.º C-15003 a
diversos tratamientos mutágenos produce mutantes a los que
les falta sustancialmente la capacidad de producir pigmen-
tos solubles, mutantes con micelios de sustrato que son -
incoloros, verdes amarillentos, canela rojizos o rojos-na-
10 ranja, mutantes cuyas hifas son fáciles de fragmentar en
elementos bacilares o fragmentos de hifa cortos ramifica-
dos, y mutantes con abundantes micelios aéreos blancos o
sustancialmente sin micelios aéreos.

15 El medio empleado para el cultivo de tal cepa produc-
tora de antibiótico C-15003 puede ser cualquier medio lí-
quido y sólido, solo si contiene nutrientes que la cepa -
pueda utilizar, aunque se prefiere un medio líquido para
grandes tandas de producción. El medio puede comprender
fuentes de carbono y nitrógeno que la cepa n.º C-15003 pue-
20 da asimilar y digerir, materia inorgánica, trazas de nu-
trientes, etc. Como ejemplos de dichas fuentes de carbo-
no se pueden mencionar la glucosa, lactosa, sacarosa, mal-
tosa, dextrina, almidón, glicerina, manita, sorbita, etc,
grasas y aceites (p.ej. aceite de soja, aceite de manteca
25 de cerdo, aceite de pollo, etc), etc. Las fuentes de ni-
trógeno pueden ser, por ejemplo, extracto de carne, ex-
tracto de levadura, levadura seca, harina de soja, líqui-
do de maceración de maíz, peptona, harina de semilla de -
algodón, melazas agotadas, urea, sales amónicas (p.ej. --
30 sulfato amónico, cloruro amónico, nitrato amónico, aceta-

1 to amónico, etc), etc. El medio puede contener además sa
les de sodio, potasio, calcio, magnesio, etc, sales de --
hierro, magnesio, cinc, cobalto, níquel, etc, sales de --
ácido fosfórico, ácido bórico, etc, y sales de ácido orgá
5 nico tales como acetatos y propionatos. Además, el medio
puede contener, como adiciones, diversos aminoácidos (p.
ej. ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, glicina, -
lisina, metionina, prolina, etc), péptidos (p.ej. dipépti
dos, tripéptidos, etc), vitaminas (p.ej. B₁, B₂, ácido ni
10 cotínico, B₁₂, C, E, etc), ácidos nucleicos (p.ej. purina,
pirimidina y sus derivados), etc. Para fines de ajuste -
del pH del medio se puede añadir un ácido inorgánico u or
gánico, álcali, tampón o similares. También se pueden --
añadir, como antiespumantes, cantidades adecuadas de acei
15 tes, grasas, tensioactivos, etc.

El cultivo se puede efectuar en cualquiera de los es
tados de cultivo estático, con agitación, sumergido aero-
bio, y otros. Para grandes tandas de producción se pre--
fiere, desde luego, el cultivo aerobio sumergido. Aunque
20 las condiciones de cultivo dependen, naturalmente, del es
tado y composición del medio, cepa, método de cultivo y -
otros factores, normalmente se prefiere efectuar la incu-
bación a 20 a 35°C con un pH inicial de aproximadamente -
7,0 o alrededor. Es particularmente deseable una tempera
25 tura de 23 a 30°C en una etapa intermedia de cultivo, con
un pH inicial de 6,5 a 7,5. Aunque el tiempo de incuba--
ción también es variable según los mismos factores que se
han mencionado antes, es aconsejable continuar la incuba-
ción hasta que el título del producto antibiótico deseado
30 se haya hecho máximo. En el caso del cultivo con agita--

1 -ción o cultivo aerobio sumergido en medio líquido, el tiempo requerido está comprendido normalmente entre aproximadamente 48 y 144 horas.

5 La potencia del antibiótico se determinó con Tetrahymena pyriformis W como organismo de determinación. Así, el anterior microorganismo se cultivó en un medio de ensayo (20 g de proteosa-peptona (Difco), 1 g de extracto de levadura (Difco), 2 g de glucosa, 1000 ml de agua destilada y 10 ml de tampón de fosfato 1M (pH 7,0)), a 28°C durante 44 a 48 horas, y se determinó la potencia del antibiótico por el método de dilución en serie, con vigilancia de la turbidez del crecimiento, efecto sobre células de tumor ascites, y por determinación cromatográfica en capa delgada (CCD abreviadamente), a describir más adelante.

15 El nuevo antibiótico C-15003 P-3, P-3' y/o P-4 se produce y acumula en el caldo de fermentación resultante, tanto extracelular como intracelularmente.

20 Estas sustancias se han detectado también por CCD. Así, el caldo de fermentación se divide en células y filtrado, por filtración o centrifugación, y el filtrado se somete a extracción con el mismo volumen de acetato de etilo. Se añade a las células la misma cantidad de acetona-agua al 70% que de filtrado, y la suspensión se filtra tras una hora de agitación a 20°C. La acetona se elimina del filtrado, y el filtrado acuoso resultante se somete a extracción con acetato de etilo. Cada uno de los extractos se concentra a 1/100 en volumen y se somete a cromatografía en capa delgada, sobre gel de sílice-placa de vidrio (Merck, Alemania Occidental, Kieselgel 60 F 254, 0,25

25

30

1 mm, 20 x 20) (sistema disolvente: cloroformo-metanol = 9:1).
La potencia se determinó en base a la intensidad de las --
manchas, detectadas por irradiación con luz ultravioleta a
2537 Å.

5 Debido a que el C-15003 P-3, P-3' y/o P-4 que así se
producen en el caldo de fermentación son sustancias lipófi
las neutras, se pueden recuperar convenientemente por méto
dos de separación y purificación que se emplean normalmen
te para la recogida de tales metabolitos microbianos. Per
10 ejemplo, se puede emplear un método que utilice la diferen
cia de solubilidad entre el antibiótico y la impureza, me
dios que utilicen la afinidad de adsorción de diversos ad
sorbentes, tales como carbono activo, resinas no iónicas --
macroporosas, gel de sílice, alúmina, etc, un método para
15 eliminar impurezas mediante resinas intercambiadoras de --
iones, etc, aplicados solos o en combinación adecuada, o --
aplicados en repetición.

Dado que, como se ha dicho antes, el C-15003 P-3, P-3'
y P-4 se presenta tanto en el filtrado como en las células,
20 los antibióticos se separan y purifican mediante tal adsor
bente, si se emplea, directamente o tras una extracción --
con disolvente en el caso de filtrado, o tras una extrac--
ción con disolvente en el caso de las células microbianas.
La extracción con disolvente se puede efectuar por cual---
25 quiera de los métodos siguientes y otros, p.ej. (1) extrac
ción con disolvente del caldo de cultivo, antes de la sepa
ración de las células, y (2) extracción con disolvente de
células y filtrado obtenidos por filtración, centrifuga---
ción u otro procedimiento. Para someter a extracción inde
30 pendiente el filtrado y las células, se puede seguir

1 - ventajosamente el método siguiente.

Los disolventes adecuados para extracción del filtra-
do son disolventes orgánicos inmiscibles con el agua, ta-
les como ésteres de ácido graso, p.ej. acetato de etilo y
5 acetato de amilo; alcoholes, p.ej. butanol; hidrocarburos
halogenados, p.ej. cloroformo; y cetonas, p.ej. metil-iso
butil-cetona. La extracción se efectúa a un pH próximo a
la neutralidad, y preferiblemente el fluido de cultivo, -
previamente ajustado a pH 7, se somete a extracción con -
10 acetato de etilo. El extracto se lava con agua y se con-
centra bajo presión reducida. Luego se añade al concen-
trado un disolvente no polar, tal como éter de petróleo o
hexano, y se recupera el producto I crudo, que contiene -
el compuesto activo. Debido a que por CCD se detecta un
15 cierto número de manchas además del antibiótico C-15003,
el producto I se somete en secuencia a los siguientes mé-
todos de purificación. Así, como método rutinario de pu-
rificación es útil la cromatografía de adsorción, y para
este fin se puede emplear uno de los adsorbentes comunes,
20 tal como gel de sílice, alúmina, resina no iónica macropo-
rosa adsorbente, etc. Para purificación a partir del pro-
ducto I crudo, la gel de sílice es muy útil. Y se puede
efectuar el revelado, por ejemplo, partiendo de éter de -
petróleo y hexano, y la elución del antibiótico C-15003 -
25 se efectúa por adición de un disolvente polar, tal como -
acetato de etilo, acetona, etanol o metanol. En un proce-
dimiento típico, usando gel de sílice (Merck, Alemania Oc-
cidental, 0,05-0,2 mm) como soporte, la cromatografía en
columna se efectúa con un aumento en serie de la propor-
30 ción entre hexano y acetato de etilo. Se toman muestras
del eluato y se investiga por CCD, y las fracciones que -

1 contienen C-15003 se mezclan y concentran bajo presión re-
ducida. Luego se añade al concentrado éter de petróleo o
hexano, con lo que se obtiene el producto II crudo. Dado
que este producto aún contiene impurezas, se purifica más
5 como sigue. Por ejemplo, el producto II se puede purifi-
car mediante una segunda columna de gel de sílice, usando
un segundo sistema disolvente. El sistema de revelado pa-
ra este fin puede consistir en un hidrocarburo halogenado,
tal como diclorometano o cloroformo, con adición de un di-
10 solvente polar tal como un alcohol, p.ej. metanol o etanol,
una cetona, p.ej. acetona o metil-etil-cetona, o simila-
res. De esta manera se aísla el antibiótico C-15003. El
orden de los sistemas disolventes empleados para las co-
lumnas de gel de sílice primera y segunda se puede inver-
15 tir, y además se pueden usar disolventes orgánicos ordina-
rios conjuntamente con los sistemas anteriores, si es ne-
cesario.

Si se usa una resina macroporosa adsorbente como me-
dio de purificación para el producto II crudo, la elución
20 del antibiótico C-15003 se efectúa con una mezcla de agua
con un alcohol inferior, una cetona inferior o un éster.
El alcohol inferior puede ser, por ejemplo, metanol, eta-
nol, propanol o butanol, y la cetona inferior puede ser,
por ejemplo, acetona o metil-etil-cetona. El éster puede
25 ser, por ejemplo, acetato de etilo. En un método típico,
el producto II crudo se disuelve en metanol-agua al 60%,
y se adsorbe en una columna de Diaion HP-10 (Mitsubishi -
Kasei K.K.).

La columna se lava con metanol-agua al 70%, y luego
30 se efectúa la elución con metanol-agua al 90%. De esta -

1 -manera se eluye de la columna el antibiótico C-15003.

En cualquiera de los procedimientos antes descritos, -
las fracciones que contienen antibiótico C-15003 se mez-
clan y concentran bajo presión reducida. Se añaden al pro-
5 ducto seco 5 a 8 volúmenes de acetato de etilo, y la mez-
cla se deja reposar, tras lo cual se separan cristales de
antibiótico C-15003. Estos cristales contienen C-15003 --
P-3, P-3' y P-4. Estos compuestos se separan luego uno de
otro mediante un adsorbente tal como los antes mencionados.
10 Así, usando gel de sílice ó una resina no iónica macroporo-
sa adsorbente, y los anteriores disolventes, los compues-
tos deseados se pueden eluir fraccionadamente. Cuando se
emplea gel de sílice, por ejemplo, el revelado se efectúa
con hexano, acetato de etilo o cloroformo-metanol, con lo
15 que el C-15003 P-4, P-3' y P-3 emergen en ese orden. Tras
detección por CCD, las fracciones correspondientes a - - -
C-15003 P-4, P-3' y P-3 se concentran, respectivamente, ba-
jo presión reducida, y se añade acetato de etilo a los con-
centrados. De esta manera se obtienen los compuestos res-
20 pectivos, como cristales. Cuando se emplea una resina no
iónica macroporosa adsorbente, se puede utilizar elución -
con gradiente, con una proporción variable entre alcohol,
cetona o éster y agua. Por ejemplo, por el método de elu-
ción con gradiente, implicando el uso de metanol-agua al -
25 60% y metanol-agua al 95%, añadiendo 5% de cloruro sódico,
el C-15003 P-3, P-3' y P-4 emergen en el orden mencionado.
Tras tomar muestras y detectar por CCD, cada grupo de frac-
ciones activas se concentra bajo presión reducida y se - -
cristaliza con acetato de etilo. Los cristales aislados -
30 comprenden acetato de etilo como disolvente de cristaliza-

1 -ción, y tras secar sobre pentóxido de fósforo a 70°C duran
te 8 horas, muestran las siguientes propiedades físicas y
químicas (Tabla 4).

5

10

15

20

25

30

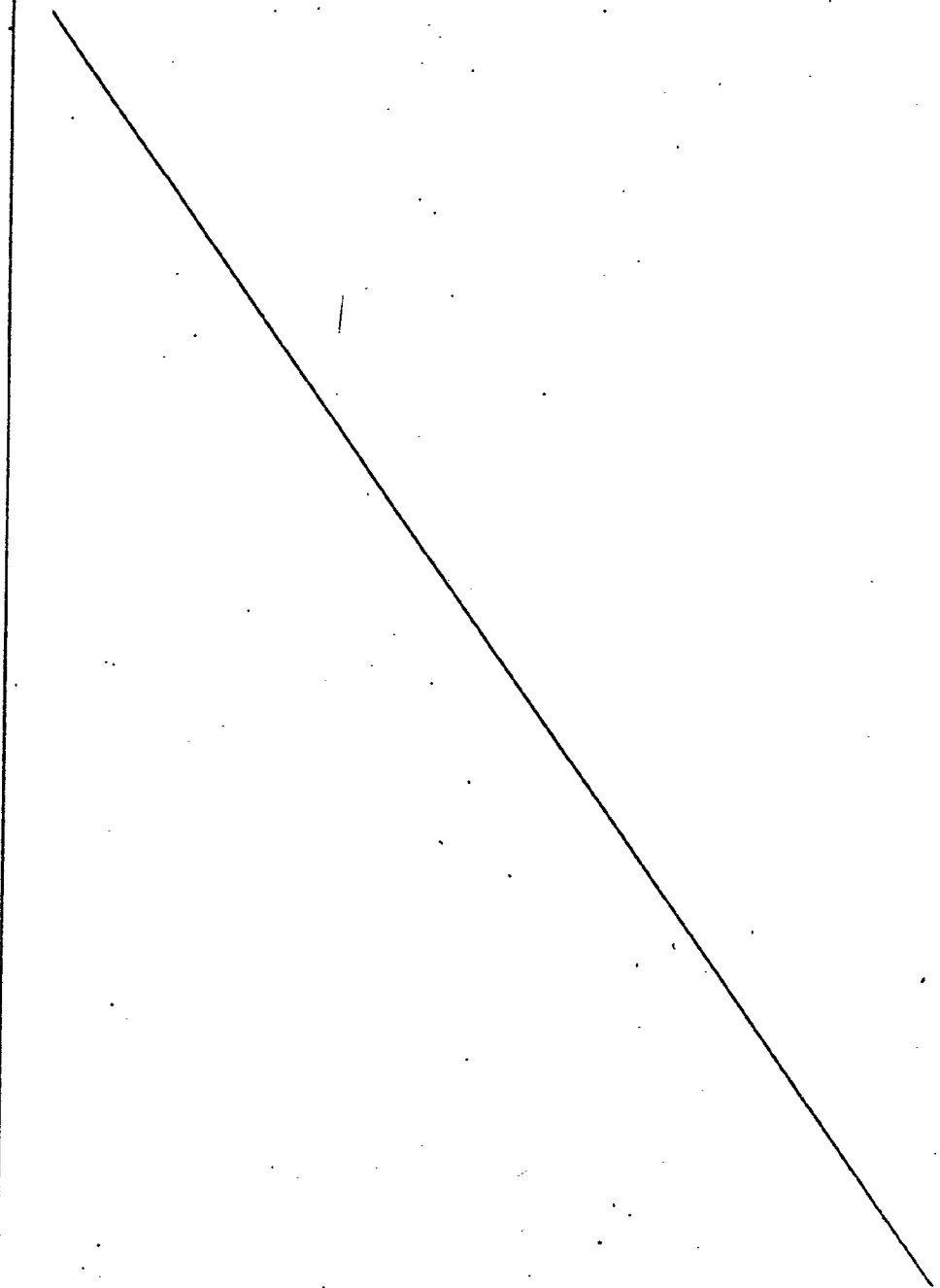


Tabla 4

Antibiótico G-15003

P-3 $C_{32}H_{43}ClN_2O_9 = 635,169$ P-3' $C_{32}H_{43}ClN_2O_9 = 635,169$ P-4 $C_{33}H_{45}ClN_2O_9 = 649,196$

Punto de fusión ($^{\circ}C$) 190 - 192 $^{\circ}$ 182 - 185 $^{\circ}$ 177 - 180 $^{\circ}$

Rotación específica
 $(\alpha)_D^{22}$ -136 $^{\circ} \pm 10^{\circ}$ -134 $^{\circ} \pm 10^{\circ}$ -142 $^{\circ} \pm 10^{\circ}$
 $(C=0,375 CHCl_3)$ $(C=0,11 CHCl_3)$ $(C=0,522 CHCl_3)$

Análisis elemental

C	60,06	60,09	60,65
H	7,04	7,02	7,05
N	4,33	4,34	4,25
Cl	5,37	5,99	5,23

Análisis elemental
 Calculado (%)

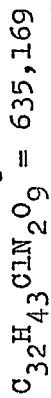
C	60,51	60,51	61,05
H	6,82	6,82	6,99
N	4,41	4,41	4,32
Cl	5,58	5,58	5,46

Antibiótico G-15003

	P-3 $C_{32}H_{43}ClN_2O_9 = 635, 169$	P-3' $C_{32}H_{43}ClN_2O_9 = 635, 169$	P-4 $C_{33}H_{45}ClN_2O_9 = 649, 196$
Espectro de absorción ultravioleta, nm (ξ) (en metanol)	233(30250) 240(in.28450) 252(27640) 280(5750) 288(5700)	233(30155) 240(in.28250) 252(27600) 280(5750) 288(5700)	233(29900) 240(in.28240) 252(27590) 280(5712) 288(5680)
Espectro de absorción infrarrojo (cm^{-1}), KBr	1740, 1730, 1670, 1580 1445, 1385, 1340, 1255 1180, 1150, 1100, 1080, 1038	1740, 1730, 1670, 1580, 1445, 1385, 1340, 1255, 1180, 1150, 1100, 1080, 1038	1740, 1730, 1670, 1580 1445, 1385, 1340, 1255 1180, 1150, 1100, 1080, 1038
Espectro de resonancia magnética nuclear (ppm) 100 MHz en $CDCl_3$	1,27(d) (3H) 1,28(d) (3H)	1,06(t) (3H)	1,03(d) (6H)
Espectro de masas (m/e)	573, 485, 470, 450	573, 485, 470, 450	587, 485, 470, 450

Antibiótico C-15003

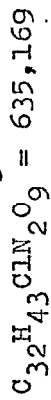
P-3



Solubilidad

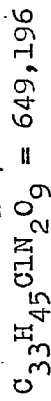
Insoluble en éter de petróleo, hexano y agua. Poco soluble en benceno y éter. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol, piridina, tetrahidrofuran y sulfóxido de dimetilo

P-3'



Insoluble en éter de petróleo, hexano y agua. Poco soluble en benceno y éter. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol, piridina, tetrahidrofuran y sulfóxido de dimetilo

P-4



Insoluble en éter de petróleo, hexano y agua. Poco soluble en benceno y éter. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol, piridina, tetrahidrofuran y sulfóxido de dimetilo

Reacciones de color

Dragendorff : positivo
Beilstein: positivo

Dragendorff: positivo
Beilstein: positivo

Dragendorff: positivo
Beilstein: positivo

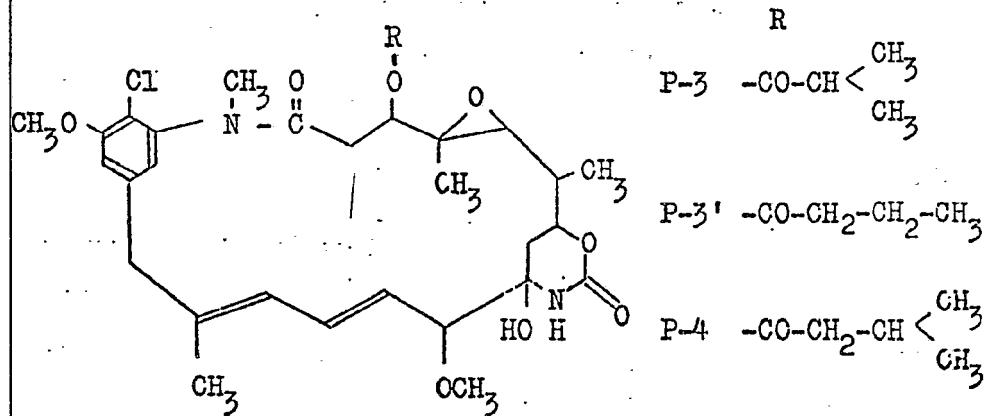
1 En base a la anterior fórmula molecular que se ha mos-
 trado antes, y a los datos de actividad antimicrobiana y -
 antitumor que se dan más adelante, el presente antibiótico
 se comparó con los grupos conocidos de antibióticos. La -
 5 búsqueda en la bibliografía no pudo localizar grupos dife-
 renciados similares al antibiótico C-15003. Sin embargo,
 la búsqueda de sustancias que pudieran dar absorciones ul-
 travioletas similares a las del presente antibiótico, en--
 tre componentes de plantas y otros compuestos orgánicos --
 10 presentes en la naturaleza, condujo a los grupos de la maitanacina, y en base a las fórmulas moleculares implicadas,
 en particular, se supuso que el antibiótico pertenece al -
 grupo de compuestos de la maitanacina que contiene dos - -
 átomos de nitrógeno. La maitanacina se obtuvo como compo-
 15 nente de plantas, y se presentó en Journal of the American
 Chemical Society 97, 5294 (1975). El espectro de masas de
 la maitanacina es como sigue:

	$M^+-(a)$	$M^+-(a+b)$	485-CH ₃	485-Cl
	545	485	470	450
20	(a)=H ₂ O + HNCO		$\begin{array}{c} O \\ \\ (b)=R-C-OH \end{array}$	

La presencia de m/e 485, 470 y 450 para C-15003 P-3, P-3' y
 P-4 convenció inmediatamente a los presentes autores de -
 que estos compuestos tienen una estructura de esqueleto -
 25 idéntica a la de la maitanacina, diferenciándose de la --
 maitanacina en la clase de grupo acilo en posición 3. Por
 tanto, está claro que el antibiótico C-15003 es un compues-
 to nuevo. Cuando el C-15003 P-3, P-3' y P-4, cada uno, -
 se degradó con álcali y se analizó por cromatografía de -
 30 gases para determinar los ácidos carboxílicos liberados, -

1 se halló que se podían obtener ácido isobutírico, ácido -
 5 butírico y ácido isovalérico, respectivamente, de C-15003
 P-3, C-15003 P-3' y C-15003 P-4. La fig. 1 muestra las -
 estructuras del C-15003 P-3, P-3' y P-4, en base a los an
 teriores datos.

Fig. 1



Actividad biológica:

A) Actividad antimicrobiana

20 Con agar de tripticasa-soja (BBL) como medio de de--
 terminación, se investigaron por el método del disco de -
 papel las concentraciones inhibitorias contra los microor
 ganismos citados a continuación. Así, discos de papel de
 filtro (Toyo Seisakusho, tipo delgado, 8 mm de diámetro),
 impregnados cada uno con 0,02 ml de una solución con 300
 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de C-15003 P-3, P-3' o P-4, se pusieron sobre pla-
 cas inoculadas respectivamente con los microorganismos ci
 tados a continuación, para investigar las concentraciones
 inhibitorias mínimas. Los resultados mostraron que los -
 antibióticos no tenían actividad contra los siguientes mi
 croorganismos:

30 Escherichia coli, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis,

1 Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Klebsiella pneumoniae,
Serratia marcescens, Mycobacterium avium

5 Por otra parte, con placas de agar que contienen el medio de determinación (3,5 g de hidrogenofosfato disódico, 0,5 g de dihidrogenofosfato monopotásico, 5 g de extracto de levadura (Difco), 10 g de glucosa, 15 g de agar, 1000 ml de agua destilada, pH 7,0), se determinó la inhibición de crecimiento frente a Talaromyces avellaneus. En esta determinación, las concentraciones inhibitorias mínimas fueron 3 $\mu\text{g/ml}$ para C-15003 P-3 y P-3', y 1,5 $\mu\text{g/ml}$ para C-15003 P-4. Además, la cepa natural de Tetrahymena pyriformis W, como organismo de determinación, se cultivó en un medio de determinación (compuesto por 20 g de proteosa-peptona (Difco), 1 g de extracto de levadura, 2 g de glucosa, 1000 ml de agua destilada y 10 ml de tampón de fosfato LM, pH 7,0), a 28°C, durante 44 a 48 horas, y la actividad inhibitoria de crecimiento de los compuestos antibióticos frente a este microorganismo concreto se determinó por el método de dilución en serie. La inhibición del crecimiento tuvo lugar a 1 $\mu\text{g/ml}$ para el C-15003 P-3 y P-3', y a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para el C-15003 P-4.

15 La actividad antifúngica se muestra en la Tabla 5. Como se ve por la Tabla 5, el C-15003 tiene actividad inhibitoria del crecimiento frente a microorganismos que causan enfermedades de plantas. Los discos de papel de filtro impregnados con 0,02 ml de una solución de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de C-15003 se pusieron sobre placas, inoculadas respectivamente con los microorganismos según la siguiente Tabla 5.

30

1 Tabla 5 - Espectro antimicrobiano

	Organismos de ensayo	Número IFO	Medio	Hora	Diámetro de inhibición
5	<i>Alternaria kikuchiana</i>	7515	APS ^{KK}	48	38
	<i>Fusicladium levieri</i>	6477	APS ^{KK}	90	68
	<i>Helminthosporium sigmoideum</i> var. <i>irregulare</i>	5273	APS ^{KK}	48	55
	<i>Pyricularia oryzae</i>	-	APS ^{KK}	48	53
10	<i>Elsinoe fawcetti</i>	8417	APS ^{KK}	90	55
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cucumerinum</i>	-	APS ^{KK}	48	20
	<i>Guignardia loricata</i>	7888	APS ^{KK}	48	12
	<i>Cochlioborus miyabeanus</i>	5277	APS ^{KK}	48	60
15	<i>Diaporthe citri</i>	9170	APS ^{KK}	48	55
	<i>Gibberella zeae</i>	8850	APS ^{KK}	48	37
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	9395	APS ^{KK}	90	65
	<i>Venturia pirina</i>	6189	APS ^{KK}	48	50
	<i>Pellicularia sasakii</i>	9253	APS ^{KK}	48	50
20	<i>Pythium aphanidermatum</i>	7030	APS ^{KK}	48	58
	<i>Botrytis cinerea</i>	-	APS ^{KK}	48	48
	<i>Aspergillus niger</i>	4066	APS ^{KK}	48	0
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	4626	APS ^{KK}	48	35
	<i>Rhizopus nigricans</i>	6188	APS ^{KK}	48	25
25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0209	APS ^{KK}	48	0
	<i>Rhodotorula rubra</i>	0907	APS ^{KK}	48	28
	<i>Trichophyton rubrum</i>	5467	GB ^{KKK}	48	38
	<i>Trichophyton mantagrophytes</i>	7522	GB ^{KKK}	48	38
30	<i>Candida albicans</i>	0583	GB ^{KKK}	48	0

Organismos de ensayo	Número IFO	Medio	Hora	Diámetro de inhibición
Candida utilis	0619	GB ^{***}	48	0
Cryptococcus neoformans	0410	GB ^{***}	48	43

* APS: medio de agar de patata sacarosa

*** GB: medio de agar nutritivo de glucosa

B) Actividad antitumor

Se investigaron los efectos terapéuticos del C-15003 P-3, P-3' y P-4 (dosificados intraperitonealmente durante 9 días consecutivos) sobre la leucemia P388 en ratones (1 x 10⁶ células/animal, ratón, transplantado intraperitonealmente). Los resultados mostraron que, en términos de proporción de extensión de la duración de la vida, estos compuestos tienen una actividad antitumor tan alta como 200%, al nivel de dosis de 0,00625 mg/kg/día.

C) Toxicidad

En un ensayo de toxicidad aguda con ratones como animales de ensayo, y que implicó inyecciones intraperitoneales de C-15003 P-3, P-3' y P-4, todos estos antibióticos mostraron un valor DL₅₀ mayor que 0,313 mg/kg.

Como se ha mencionado antes, el presente antibiótico C-15003 tiene fuerte actividad inhibitoria contra hongos y protozoos, y por tanto es valioso como agente antifúngica o antiprotozoos. Además, debido a que el antibiótico C-15003 presenta una acción extensora de la duración de la vida, sobre los animales mamíferos que padecen tumor (p.ej. el ratón), también se espera que el compuesto tendrá uso como droga antitumor.

El antibiótico C-15003, como agente antifungal y an-

1 -tiprotozoos, se puede usar ventajosamente para determina-
ción de la ecología bacteriana en terrenos, lodos activos,
fluidos del cuerpo de animales, o similares. Así, cuando
5 se han de aislar bacterias valiosas de muestras de terre-
no, o cuando se han de evaluar acciones de bacterias inde-
pendientemente de las de hongos y protozoos, en relación
con el funcionamiento y análisis de un sistema de lodos -
activos usado en el tratamiento de aguas residuales, el -
presente antibiótico se puede utilizar para obtener un --
10 crecimiento selectivo de la flora bacteriana, sin permitir
el crecimiento concomitante de hongos y protozoos en la -
muestra. En un caso típico, la muestra se añade a un me-
dio líquido o sólido, y se añaden 0,1 ml de una solución
de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico en metanol-agua al 1%,
15 por ml del medio, que luego se incuba.

El presente antibiótico C-15003 también se puede usar
como agente antimicrobiano para el tratamiento de enferme-
dades de plantas causadas por los microorganismos mencio-
nados en la anterior Tabla 5.

20 En la aplicación típica, el antibiótico C-15003 se -
usa en forma de solución acuosa metanólica al 1%, que con-
tiene 0,5 $\mu\text{g/ml}$ - 5 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico. Por ejemplo,
el antibiótico C-15003 se puede usar para represión de la
roña marrón rojiza de las vainas, tizón, manchas de Hel-
25 minthosporium en hojas, y añublo de la vaina en plantas -
de arroz.

Así, es evidente que el C-15003 P-3, P-3' y P-4 son,
todos, compuestos nuevos que tienen la misma estructura -
de esqueleto, y que se pueden usar también como interme-
30 dios en la producción de otros compuestos farmacéuticamen-

1 -te útiles. Así, mediante una reacción de desacilación se
puede derivar del presente antibiótico el P-15003 P-0 - -
(maitansinol), con un grupo hidroxilo en posición 3. En
relación con esto, debido a que el grupo acilo está en po
5 sición beta respecto al carbonilo, se puede emplear venta
josamente la reacción usual de hidrólisis con reducción.
Así, mediante un hidruro metálico complejo (p.ej. hidruro
de litio aluminio (LiAlH_4)), a una temperatura baja (p.ej.
-20-0°C), el enlace O-éster en posición 3 se puede escin-
10 dir por hidrólisis, sin afectar a otros grupos funcionales,
p.ej. carbonilo, eposi, dobles enlaces carbono-carbo
no, etc, produciendo maitansinol. Los datos físicos y
químicos sobre esta muestra de maitansinol así obtenida -
están en buen acuerdo con los datos dados en Kupchan y --
15 otros, The Journal of American Chemical Society 97, 5294-
5295 (1975)).

Los siguientes ejemplos ilustran más, pero en modo al
guno son limitativos de la invención, y en ellos la(s) --
"parte(s)" están basadas en peso, a no ser que se indique
20 otra cosa, y la relación entre "parte(s)" y "parte(s) en
volumen" se corresponde a la que hay entre "gramo(s)" y -
"mililitro(s)", y "%" está basado en "peso/volumen", a no
ser que se indique otra cosa.

Ejemplo 1

25 Se usó Nocardia nº C-15003 (IFO 13726; FERM 3992; - -
ATCC 31281), cultivado en un medio (agar de extracto de le
vadura-extracto de malta), para inocular un fermentador de
200 partes en volumen que contenía 40 partes en volumen de
un medio de cultivo de siembra (2% de glucosa, 3% de almi-
30 dón soluble, 1% de harina de soja cruda, 1% de licor de ma

1 ceración de maíz, 0,5% de polipeptona, 0,3% de NaCl, 0,5%
de CaCO_3 , pH 7,0). El medio inoculado se incubó a 28°C -
durante 48 horas, para obtener un inóculo. Una porción -
5 de 0,5 partes en volumen del inóculo así obtenido se trans-
firió a un fermentador de 200 partes en volumen, que con-
tenía 40 partes en volumen de un medio de fermentación com-
puesto por 5% de dextrina, 3% de licor de maceración de -
maíz, 0,1% de polipeptona y 0,5% de CaCO_3 (pH 7,0), y se
10 cultivó a 28°C durante 90 horas, dando un inóculo (culti-
vo de siembra).

Según se determina por el método de dilución en serie,
usando Tetrahymena pyriformis W como organismo de determi-
nación, y antibiótico C-15003 P-3 como muestra patrón, se
halló que el cultivo anterior tenía un título de 25 $\mu\text{g/ml}$.

15

Ejemplo 2

Una porción de 10 partes en volumen del inóculo (siem-
bra) obtenido en el Ejemplo 1 se transfirió a un fermenta-
dor de 2000 partes en volumen, que contenía 500 partes en
volumen de un medio de cultivo de siembra (el mismo que -
20 antes), y se incubó a 28°C durante 48 horas. Una porción
de 500 partes en volumen del cultivo resultante se trans-
firió a un depósito de 50.000 partes en volumen, de acero
inoxidable, que contenía 30.000 partes en volumen de medio
de cultivo de siembra, y se cultivó a 28°C, bajo aireación
25 (30.000 partes en volumen/min), agitación (280 r.p.m. (1/2
DT)) y presión interior (1 kg/cm^2), para obtener un culti-
vo de siembra. Este cultivo se usó para sembrar un depó-
sito de 200.000 partes en volumen, de acero inoxidable, -
que contenía 100.000 partes en volumen de un medio de fer-
30 mentación similar al usado en el Ejemplo 1, a una propor-

1 ción de inoculación del 10%. El medio inoculado se incu-
bó a 28°C, bajo aireación (100.000 partes en volumen/min),
agitación (200 r.p.m. (1/2 DT)) y presión interior (1 kg/
cm²) durante 90 horas. Según se determina por el mismo -
5 método que el descrito en el Ejemplo 1, se halló que el -
cultivo antes obtenido tiene un título de 25 // g/ml.

Ejemplo 3

A 95.000 partes en volumen del cultivo obtenido en -
el Ejemplo 2 se añadieron 2.000 partes de Hyflo-supercel ^(R)
10 (Johnes and Manville Products, EE.UU.) y tras mezcla con-
cienzuda se filtró la mezcla en un filtro a presión, obte-
niendo 85.000 partes en volumen de filtrado y 32.000 par-
tes de células húmedas. El filtrado, 85.000 partes en vo-
lumen, se agitó y sometió a extracción con 30.000 partes
15 en volumen de acetato de etilo. Este método se repitió -
otra vez más. Las capas de acetato de etilo se reunieron,
se lavaron dos veces con porciones de 30.000 partes en vo-
lumen de agua, se secaron por adición de 500 partes de --
sulfato sódico anhidro, y se concentraron bajo presión re-
20 ducida hasta 200 partes en volumen. Se añadió éter de pe-
tróleo al concentrado, y el precipitado resultante se re-
cuperó por filtración (53 partes). Este producto I crudo
se agitó con 100 partes en volumen de acetato de etilo, y
los insolubles se separaron por filtración. El filtrado
25 se agitó con 10 partes de gel de sílice (Merck, Alemania
Occidental, 0,05-0,2 mm), y el acetato de etilo se elimi-
nó bajo presión reducida. El residuo se aplicó a la par-
te superior de una columna de gel de sílice (400 partes -
en volumen). La elución se efectuó con 500 partes en vo-
30 lumen de hexano, 500 partes en volumen de hexano-acetato

1 de etilo (3:1), 500 partes en volumen de hexano-acetato -
de etilo (1:1), 500 partes en volumen de hexano-acetato -
de etilo (1:3), 500 partes en volumen de acetato de etilo,
y 1.000 partes en volumen de acetato de etilo-metanol - -
5 (50:1), recogiendo el eluido en 100 fracciones de 100 par
tes en volumen.

Una porción de una parte en volumen de cada fracción
se concentró a sequedad, y se añadieron al concentrado --
0,1 partes en volumen de acetato de etilo, dando una mez-
10 cla. La mezcla se detectó a 2,5 cm del borde del fondo --
de una placa de gel de sílice-vidrio (Merck, Alemania Oc-
cidental, 60 F ²⁵⁴, 0,25 mm, 20 x 20), y se reveló duran-
te aproximadamente 17 cm con un sistema disolvente de ace
tato de etilo-metanol (19:1). Tras revelado, la detección
15 se efectuó con luz ultravioleta (2537 Å).

Las fracciones activas n.º 23-n.º 28, de Rf 0,6-0,65,
se recogieron y concentraron bajo presión reducida, hasta
aproximadamente 20 partes en volumen. A este concentrado
se añadieron 150 partes en volumen de éter de petróleo, ob
20 teniendo 15 partes de un producto II crudo.

Ejemplo 4

Con agitación, 32.000 partes de las células húmedas
obtenidas en el Ejemplo 3 se sometieron a extracción con
50.000 partes en volumen de acetona-agua al 70%, durante
25 3 horas, y luego se filtraron en un filtro a presión. La
extracción con 50.000 partes en volumen de acetona-agua -
al 70%, y subsiguiente filtración, se repitieron una vez
más. Los filtrados se reunieron, y la acetona se separó
por concentración bajo presión reducida. El sistema acuo
30 so resultante se pasó a través de una columna de 5.000 par

1 -tes en volumen de Diaion HP-10 (Mitsubishi Kasei K.K.). -
La columna se lavó con 20.000 partes en volumen de agua y
metanol acuoso al 50%, seguido por elución con 15.000 par-
5 tes en volumen de metanol-agua al 90%. El eluido se con-
centró bajo presión reducida a 3.000 partes en volumen, y
se agitó con 3.000 partes en volumen de agua y 3.000 par-
tes en volumen de acetato de etilo. Se repitió una vez -
más el método anterior. Las capas de acetato de etilo se
combinaron, se lavaron con agua, se secaron por adición -
10 de sulfato sódico anhidro, y se concentraron bajo presión
reducida hasta 200 partes en volumen. Tras adición de --
éter de petróleo, el precipitado se recuperó por filtra--
ción (28 partes). El producto anterior se purificó me---
diante una columna de gel de sílice, recuperando 8,0 par-
15 tes de producto II crudo.

Ejemplo 5

En 10 partes en volumen de acetato de etilo se disol-
vieron 1,5 partes del producto II crudo obtenido en el --
Ejemplo 3, y la solución se agitó bien con 4 partes de gel
20 de sílice (Merck, Alemania Occidental, 0,05-0,2 mm). El
acetato de etilo se eliminó bajo presión reducida. El re-
siduo se aplicó a la parte superior de una columna de 300
partes en volumen de gel de sílice, y la columna se lavó
primero con 500 partes en volumen de cloroformo, y luego
25 se eluyó con 500 partes en volumen de cloroformo-metanol
(50:1), 500 partes en volumen de cloroformo-metanol (20:1)
y 500 partes en volumen de cloroformo-metanol (10:1). El
eluido se recogió en fracciones de 25 partes en volumen.

Una porción de 0,5 partes en volumen de cada fracción
30 se concentró bajo presión reducida. Se añadieron al con-

1 -centrado 0,05 partes en volumen de acetato de etilo, y la
mezcla, como una muestra, se sometió a cromatografía en
capa delgada con gel de sílice (sistema de revelado: clo-
roformo-metanol = 9:1).

5 Las fracciones nº 39 y 40, que absorben a 2537 \AA en
la zona de Rf 0,50-0,60, se recogieron y concentraron a
sequedad bajo presión reducida. Se añadieron al residuo
2 partes en volumen de acetato de etilo, y la mezcla se
dejó reposar, con lo que se obtuvieron 0,150 partes de --
10 cristales de antibiótico C-15003.

Los anteriores cristales de antibiótico C-15003 - -
(0,150 partes) se disolvieron en 15 partes en volumen de
metanol, seguidos por adición de 0,300 partes de cloruro
sódico y 15 partes en volumen de agua. Se rellenó una co-
15 lumna con 200 partes en volumen de Diaion HP-10 (Mitsubishi
Kasei K.K.), y se calibró con 600 partes en volumen de me-
tanol-agua al 50% que contenía 5% de NaCl. La solución -
de muestra antes preparada se pasó por la columna, y la -
elución con gradiente se efectuó usando 1.500 partes en -
20 volumen de metanol-agua al 60%, que contenía 5% de NaCl,
y 1.500 partes en volumen de metanol-agua al 95%. El - -
eluido se recogió en fracciones de 15 partes en volumen,
y cada fracción se investigó por cromatografía en capa --
delgada con gel de sílice. Las fracciones 145 a 153 con-
25 tenían C-15003 P-3, las fracciones 167-180 contenían - - -
C-15003 P-3' y P-4, y las fracciones 185-190 contenían --
C-15003 P-4.

Cada grupo de fracciones se concentró y disolvió por
30 adición de 50 partes en volumen de agua y 100 partes en -
volumen de acetato de etilo. La solución se agitó en un

1 --embudo separador, y la capa de agua se separó, y tras la-
vado con dos porciones de 50 partes en volumen de agua, --
la capa de acetato de etilo se secó sobre sulfato sódico
anhidro, se concentró y se dejó reposar. De la anterior
5 manera se obtuvieron cristales de cada grupo de fraccio--
nes. Los cristales se recogieron por filtración y se se-
caron.

C-15003 P-3 0,070 partes

C-15003 P-3', P-4 0,018 partes

10 C-15003 P-4 0,015 partes

Los cristales mixtos de C-15003 P-3' y P-4 (0,013 --
partes) se disolvieron en 0,3 partes en volumen de aceta-
to de etilo, y se identificaron en una línea a una distan-
cia de 2,5 cm del borde del fondo de una placa de gel de
15 sílice y vidrio (Merck, Alemania Occidental, Kieselgel --
60 F₂₅₄ 0,25 mm, 20 x 20), seguido por revelado con aceta-
to de etilo-metanol (19:1). Tras revelado a aproximada--
mente 18 cm, se separaron por rascado la banda de absor--
ción a Rf 0,68 (P-4) y Rf 0,65 (P-3'), y cada una se some-
20 tió independientemente a extracción dos veces con acetato
de etilo que contenía una pequeña cantidad de agua. El --
extracto resultante en acetato de etilo se lavó con agua,
se secó sobre sulfato sódico anhidro, se concentró bajo --
presión reducida y se dejó reposar.

25 Se obtuvieron 0,010 partes de cristales de C-15003 --
P-4 y 0,003 partes de cristales de C-15003 P-3' de las --
fracciones de Rf 0,68 y Rf 0,65, respectivamente.

Ejemplo 6

30 Se inocularon mil partes en volumen del cultivo del
Ejemplo 2 en un depósito de 200.000 partes en volumen, de

1 -acero inoxidable, que contenía 100.000 partes en volumen
de un medio de cultivo de siembra, y el medio inoculado -
se incubó a 28°C bajo aireación (100.000 partes en volumen/
5 min) y agitación (200 r.p.m.) durante 48 horas, para pre-
parar un cultivo de siembra. Este cultivo de siembra se
transfirió a un depósito de 2.000.000 partes en volumen,
de acero inoxidable, que contenía 1.000.000 partes en vo-
lumen de un medio de fermentación similar al usado en el
Ejemplo 1, a una proporción de trasplante del 10%. El --
10 cultivo se efectuó a 28°C bajo aireación (1.000.000 partes
en volumen/min), agitación (120 r.p.m. (1/3 DT)) y presión
interior (1 kg/cm²) durante 90 horas. Se halló que el cul-
tivo resultante tenía un título de 20 µg/ml, según se de-
termina por el método de determinación descrito en el Ejem-
15 plo 1.

A 900.000 partes en volumen del anterior cultivo se -
añadieron 900.000 partes en volumen de acetona, y tras una
hora de agitación se añadieron 20.000 partes de Hyflo-Su--
percel (Johnes & Manville, EE.UU.). Se siguió agitando la
20 mezcla, y se filtró en una máquina de filtro a presión.

A 1.700.000 partes en volumen del filtrado resultante
se añadieron 500.000 partes en volumen de agua, y, en un -
Podbielniak (Podbielniak, Inc.) se sometió la mezcla a ex-
tracción con 1.000.000 partes en volumen de acetato de eti-
25 lo. La capa de acetato de etilo se lavó con agua, se secó
por adición de sulfato sódico anhidro, y se concentró bajo
presión reducida. Se añadió éter de petróleo al concentra-
do, y el precipitado resultante se recuperó por filtración
y se secó. Por el método anterior se obtuvieron 68 partes
30 de producto I crudo. Después, como en los Ejemplos 3, 4 y

1 5, este producto crudo se purificó, obteniendo 9,5 partes de C-15003 P-3, 0,300 partes de C-15003 P-3' y 2,5 partes de C-15003 P-4.

Ejemplo 7

5 En 1 parte en volumen de tetrahidrofurano se disolvieron 0,015 partes de cristales del antibiótico C-15003, obtenido en el Ejemplo 5, y tras haber enfriado la solución hasta -5°C, se añadieron 0,012 partes de hidruro de litio aluminio. Se dejó reposar la mezcla durante 2 horas. Tras
 10 adición de 0,5 partes en volumen de una solución acuosa de H_2SO_4 al 1%, la mezcla de reacción se sometió a extracción con 2 partes en volumen de acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó con agua, se secó por adición de sulfato sódico anhidro, y se concentró bajo presión reducida. La CCD preparativa con gel de sílice se efectuó con -
 15 el concentrado, y la zona de Rf 0,25 a 0,3 se separó por rascado y se sometió a extracción con acetato de etilo que contenía una pequeña cantidad de agua. El extracto se lavó con agua, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró bajo presión reducida, con lo que se separaron cristales. Los cristales se recuperaron por filtración y se -
 20 secaron. Por el método anterior se obtuvieron 0,010 partes de P-15003 P-0, punto de fusión 174°C.

25 Análisis elemental: Hallado C, 59,65; H, 6,58; N, 5,02;
 Cl, 6,51

Calculado para $C_{28}H_{37}ClN_2O_8$ C, 59,52; H, 6,60; N, 4,96;
 Cl, 6,27

IR: 1715, 1670, 1580 (cm^{-1})

UV (nm): 232(32750), 244(inflexión, 30850), 252(31650),
 30 281(5750), 288(5700)

1 En propiedades, este producto es idéntico al maitansi
nol.

5

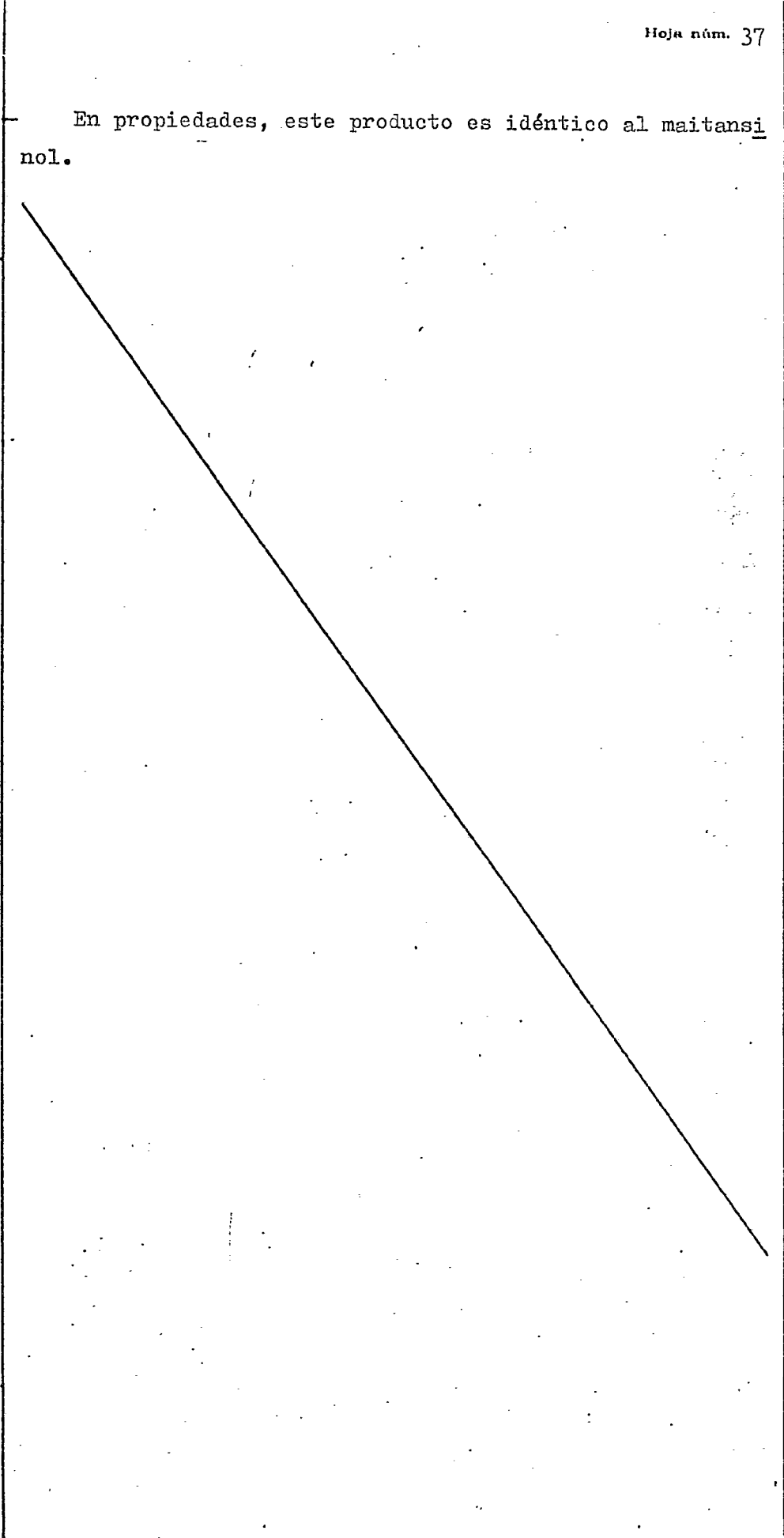
10

15

20

25

30



1

REIVINDICACIONES

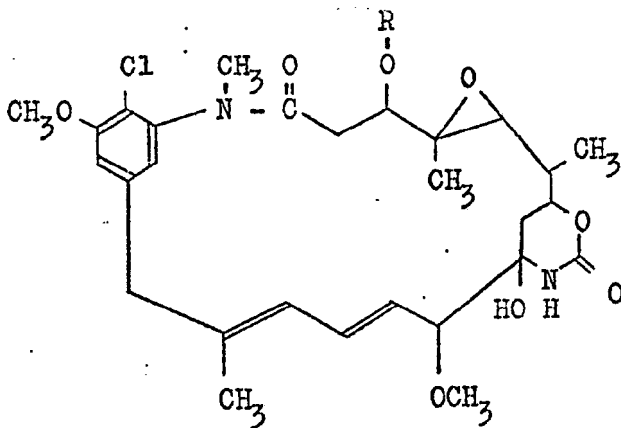
5

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

10

1ª.- Un método para producir el antibiótico C-15003, que tiene la fórmula general:

15



20

donde R representa $-\text{CO}-\text{CH} \begin{matrix} / \text{CH}_3 \\ \backslash \text{CH}_3 \end{matrix}$, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ o

25

$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} / \text{CH}_3 \\ \backslash \text{CH}_3 \end{matrix}$, que comprende cultivar un microorganismo

30

perteneciente al género Nocardia y que es capaz de producir antibiótico C-15003, en un medio de cultivo que contiene

AP

