

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

| | | |
|-------|--------------------------|-------|
| 10 ES | 11 NUMERO | 12 AI |
| | 475.178 | |
| | 22 FECHA DE PRESENTACION | |
| | 17.11.78 | |

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

| | | |
|-----------------|----------|---------|
| 30 PRIORIDADES: | 32 FECHA | 33 PAIS |
| 31 NUMERO | | |
| 139385/77 | 18.11.77 | Japón |

| | | |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 47 FECHA DE PUBLICIDAD | 61 CLASIFICACION INTERNACIONAL | 62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
| | C07G | |

| |
|--|
| 64 TITULO DE LA INVENCION |
| "UN METODO MEJORADO PARA PRODUCIR ANTIBIOTICO C-15003 P-3" |

| |
|----------------------------------|
| 71 SOLICITANTE (S) |
| TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. |

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

| |
|--|
| 72 INVENTOR (ES) |
| Eiji Higashide, Kazunori Hatano y Mitsuko Asai |

| |
|-----------------|
| 73 TITULAR (ES) |
| |

| |
|--|
| 74 REPRESENTANTE |
| D. FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 70.389) |

1 Esta invención se refiere a un método para produ-
cir antibiótico C-15003 P-3 en un método industrialmente
ventajoso.

5 El antibiótico C-15003 P-3 (mas adelante se abre-
via como "P-3") es un nuevo compuesto obtenido cultivando
un microorganismo del género Nocardia, que se aísla a par-
tir de recursos naturales.

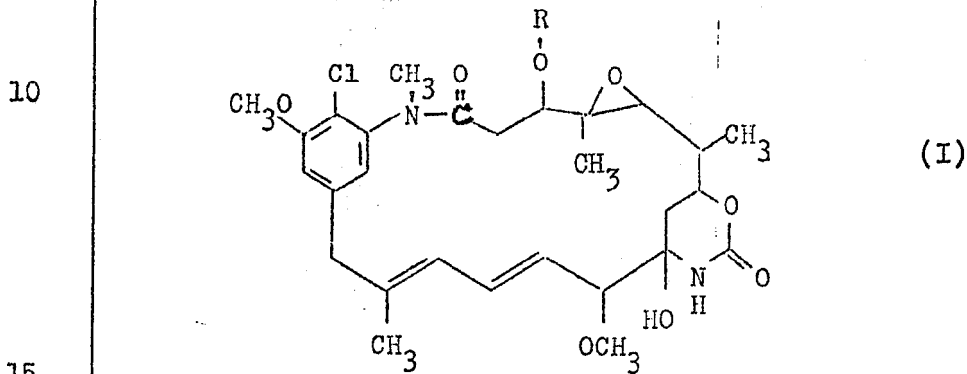
10 Los microorganismos que pueden emplearse en la
presente invención cuando se cultivan mediante el uso de
medios de cultivo convencionales, producen en general va-
rios componentes de antibiótico C-15003, simultáneamente.
Para separar cada componente del caldo cultivado, se re-
quieren procedimientos muy complicados, lo que inevitable-
mente conduce a un bajo rendimiento del componente desea-
do.

15 Con el fin de superar esta desventaja, los inven-
tores presentes han efectuado estudios extensos en especial
para recuperar específicamente P-3, y han encontrado que
el P-3 puede ser obtenido en una proporción notablemente
elevada respecto al contenido total de antibiótico C-15003
20 cuando se emplea un medio de cultivo de una composición es-
pecífica.

25 La presente invención es un método para producir
antibiótico C-15003 P-3, caracterizado porque dicho método
comprende cultivar un microorganismo que pertenece al gé-
nero Nocardia y que es capaz de producir el antibiótico
C-15003 P-3 (denominado frecuentemente en esta Memoria,
más adelante "cepa productora de antibiótico C-15003 P-3")
en un medio de cultivo que contiene valina o ácido isobu-
tírico o sus derivados o sus sales, para producir especí-
30

1 -ficamente antibiótico C-15003 P-3 en el caldo cultivado,
y recuperar antibiótico C-15003 P-3 del caldo.

En el contexto de esta invención, la expresión
"antibiótico C-15003" ó "C-15003", significa, genéricamente
te, los cuatro compuestos que tienen la siguiente fórmula
5 general (I) como un grupo o una mezcla de dos o tres de
dichos compuestos ó, separadamente, uno cualquiera de los
mismos compuestos.



(en la que R representa $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CO}-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$,

20 $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ó $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$).

Con referencia también a la fórmula general (I),
el compuesto en que R es $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ se denomina en esta
Memoria "antibiótico C-15003 P-2" o más brevemente "P-2";

25 el compuesto en que R es $-\text{CO}-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ se denomina en

esta Memoria "antibiótico C-15003 P-3" o más brevemente
"P-3"; el compuesto en que R es $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ se denomi
na en esta Memoria "antibiótico C-15003 P-3' " o más breve
mente "P-3' "; el compuesto en que R es $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$

1 - se denomina en esta Memoria "antibiótico C-15003 P-4" o,
más brevemente, "P-4".

5 Como un ejemplo de la cepa de microorganismos
que produce antibiótico C-15003 P-3, puede mencionarse la
Cepa de actinomiceto No. C-15003 (denominado abreviada-
te en esta Memoria "Cepa No. C-15003") que fue aislada del
suelo y otras muestras en la selección de microorganismos
productores de antibióticos.

10 Las características microbiológicas de la Cepa
No. C-15003 fueron investigadas mediante procedimientos
análogos a los propuestos por Schirling and Gottlieb (In
ternational Journal of Systematic Bacteriology 16, 313-340
(1966). Los resultados de observaciones a 28°C durante 21
días son los siguientes.

15 1) Caracteres morfológicos

El micelio vegetativo se extiende bien y se de-
sarrolla en ramas, tanto sobre agar como en medio líquido.
Muchas de las hifas miden de 0,8 a 1,2 μ m de diámetro y,
en ciertos casos, pueden dividirse en fragmentos que se
20 asemejan a bacterias bastonadas o hifas ramificadas de cor-
ta longitud. La cepa proporciona buen crecimiento sobre di-
versos medios taxonómicos, con micelios aéreos superpues-
tos sobre el micelio vegetativo, aun cuando frecuentemente
forma cuerpos semejantes a coremios (50-200 x 200 - 1000
25 μ m) sobre los que tiene lugar un crecimiento aéreo adi-
cional. Muchos de los micelios aéreos tienen configuración
flexuosa, recta o helicoidal suelta, que se encuentra en
algunas ocasiones. El examen microscópico de cultivos en-
30 vejecidos revela que sólo en algunos casos las células se

1 -mejantes a conidios se presentan en cadenas, mientras que
las suspensiones celulares obtenidas de las superficies
de tales cultivos, examinadas microscópicamente, contenían
muchos cuerpos elipsoideos alargados (0,8-1,2 μm x
x 4,8-6,8 μm) y elipsoideos (0,8-1,2 x 1,0 -2,0 μm) que
5 se asemejan a artrosporas.

Exámenes efectuados con microscopio electrónico
mostraron que estos cuerpos tenían superficies lisas.

2) Los constituyentes de células.

10 La cepa fue cultivada en agitación, en medio
ISP No. 1 modificado, a 28°C, durante 66 a 90 horas, al
término de cuyo tiempo las células fueron recogidas y la
vadas. Mediante el método de B.Becker y otros. (Applied
Microbiology 12, 421 (1964) y el método de M.P. Lechevalier
15 (Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 71, 934
(1968), las células totales anteriores fueron examinadas
para determinar ácido diaminopimélico y la composición de
azúcares. Se encontró que el primero era de la forma meso,
mientras que se detectaron manchas que correspondían a
20 galactosa y arabinosa.

3) Características en medios taxonómicos.

La cepa mostró un crecimiento relativamente bueno
en diversos medios, siendo el micelio vegetativo incoloro
25 o de color amarillo pálido en las fases iniciales del cul
tivo y de color tostado amarillento claro a tostado amari
lento en las fases posteriores. La cepa produce pigmentos
solubles, de color amarillo a tostado amarillento en diver
30 sos medios taxonómicos. El micelo aéreo es polvoriento y

1 por lo general da un crecimiento moderado siendo de color
de blanco a amarillo o tostado ligeramente amarillento.
Las características de la cepa en diversos medios taxonó-
micos se indican en la Tabla 1.

5 Tabla 1. Características de cultivo de la Cepa No.
C-15003 en medios taxonómicos.

(A) Sacarosa nitrato agar:

Crecimiento (C): Moderado, Amarillo Melón Brillante
(3 ia)^{SE} a tostado Ambar (3 ic)^{SE}, se
forman cuerpos parecidos a coremios.

10 Micelio aéreo (MA): Escaso, blanco

Pigmento soluble (PS): Nada o tostado amarillento pá-
lido

(B) Glicerina nitrato agar:

15 C: Moderado, Marfil claro (2 ca)^{SE}, se forman cuer-
pos parecidos a coremios.

MA: Moderado, blanco

PS: Nada

(C) Glucosa asparraguina agar:

20 C: Moderado, Anaranjado brillante (3 pa)^{SE} a Amari-
llo brillante (2 pa)^{SE}.

MA: Escaso, blanco

PS: Amarillo brillante (2 pa)^{SE}

(D) Glicerina asparraguina agar

25 C: Moderado, Marfil claro (2 ca)^{SE}, se forman cuer-
pos parecidos a coremios.

MA: escaso, blanco

PS: Nada

- 1 (E) Almidón agar:
C: Moderado, Marfil claro (2 ca)² a Trigo ligero
(2 ea)², se forman cuerpos parecidos a coremios.
MA: Abundante, Marfil claro (2 ca)²
PS: Nada
- 5 (F) Agar nutritivo:
C: Moderado, Marfil claro (2 ca)² a Amarillo colo-
nial (2 ga)², se forman cuerpos parecidos a co-
remios.
MA: Escaso, blanco
PS: Nada
- 10 (G) Malato de calcio agar:
C: Moderado, Marfil claro (2 ca)² a Trigo ligero
(2 ea)², se forman cuerpos parecidos a coremios.
MA: Moderado, blanco a Marfil claro (2 ca)²
PS: Nada
- 15 (H) Extracto de levadura-extracto de malta agar:
C: Moderado, Ambar (3 lc)² a Amarillo brillante
(3 la)², se forman cuerpos parecidos a coremios.
MA: Moderado, blanco a Marfil claro (2 ca)²
PS: Nada
- 20 (I) Harina de avena agar:
C: Moderado, Marfil claro (2 ca)² a Amarillo Colo-
nial (2 ga)², se forman cuerpos parecidos a co-
remios
MA: escaso, blanco o amarillo claro
PS: Nada
- 25 (J) Peptona extracto de levadura hierro agar:
C: Moderado, Amarillo Colonial (2 ga)²
MA: Nada
- 30

- 1 PS: Amarillo Colonial (2 ga)^x
 (K) Tirosina agar
 C: Moderado, Marfil claro (2 ca)^x a Amarillo melón
 claro (3 ea)^x, se forman cuerpos parecidos a co-
 remios.
- 5 MA: Moderado, blanco a Marfil claro (2 ca)^x,
 PS: Color camello (3 ie)^x

^x
 Los códigos de color son según el Color Harmony
 Manual, 4ª ed. (Container Corporation of Ameri-
 ca, 1958).

10

4) Caracteres fisiológicos

Los caracteres fisiológicos de la cepa se indi-
 can en la Tabla 2. Intervalo de temperatura para el creci-
 miento: 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.

15

Tabla 2: Caracteres fisiológicos de la Cepa No. -
 C-15003.

20

| | | |
|--|---|------------|
| Intervalo de temperatura para el crecimiento | : | 12 a 38°C. |
| Intervalo de temperatura para crecimiento aéreo | : | 20 a 35°C. |
| Licuefacción de gelatina | : | Positiva |
| Hidrólisis de almidón | : | Positiva |
| 25 Reducción de nitratos | : | Positivo |
| Peptonización de leche | : | Positiva |
| Coagulación de leche | : | Negativa |
| 30 Descomposición de caseína | : | Positiva |

- 1 Producción de pigmentos melanoides
 Negativa (peptona extracto de levadura hierro agar),
 / Positiva (Tirosina agar)
- Descomposición de tirosina : Positiva
 Descomposición de xantina : Negativa
 5 Descomposición de hipoxantina : Negativa
 Tolerancia a lisozima : Positiva
 Tolerancia a cloruro de sodio : 2%

10 5) Utilización de diversas fuentes de carbono
 La utilización de diversas fuentes de carbono fue investigada usando un medio descrito en Pridham y Gottlieb (Journal of Bacteriology 56, 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.

15 Tabla 3. Utilización de fuentes de carbono por la Cepa No. C-15003

| | <u>Fuente de carbono</u> | <u>Crecimiento</u> | <u>Fuentes de carbono</u> | <u>Crecimiento</u> |
|----|--------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|
| | <u>D-Xilosa</u> | + | <u>Rafinosa</u> | ± ±* |
| 20 | <u>L-Arabinosa</u> | + | <u>Melibiosa</u> | + |
| | <u>D-Glucosa</u> | ++ | <u>i-Inositol</u> | - |
| | <u>D-Galactosa</u> | + | <u>D-Sorbitol</u> | - |
| | <u>D-Fructosa</u> | +++ | <u>D-Manitol</u> | ++ |
| | <u>L-Ramnososa</u> | + | <u>Glicerol</u> | - ± |
| 25 | <u>D-Manosa</u> | +++ | <u>Almidón soluble</u> | + |
| | <u>Sacarosa</u> | ++ | <u>Control (Nada)</u> | - |
| | <u>Lactosa</u> | - | | |
| | <u>Maltosa</u> | ± | | |
| 30 | <u>Trehalosa</u> | + | | |

* Añadido medio basal con 0,1% de extracto de levadura

- 1 - Notas: +++ : Crecimiento exuberante
++ : Crecimiento bueno
/ / + : Crecimiento
± : Crecimiento malo
- : No hay crecimiento

5

6) Otras características

Las células fueron recogidas mediante el procedimiento anteriormente descrito en 2) y se preparó DNA por un procedimiento análogo al de J. Marmur y otros (Journal of Molecular Biology 3, 208, 1961). Se encontró que el contenido de G-C (guanina-citosina) del DNA era aproximadamente 71 moles %.

10

La tinción de Gram del micelio vegetativo de esta cepa fue positiva.

15

Las características anteriores de la Cepa No. C-15003 fueron comparadas con las descripciones que figuran en "The Actinomycetes Vol. 2" de S.A. Waksman (The Williams and Wilkins Co., 1961); R.E. Buchanan y N.E. Gibbons, "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ª ed., 1974"; y otras referencias bibliográficas.

20

Aun cuando se pensaba que esta cepa pertenecía al Grupo III del género Nocardia, el fallo para encontrar especies que tuvieran los caracteres antes descritos entre las especies conocidas, condujo a los inventores a llegar a la conclusión de que esta cepa representaba una nueva especie de microorganismo.

25

La presente Cepa No. C-15003 ha sido depositada en el "Fermentation Research Institute", Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (FERM), Japón, bajo el número

30

27118

1 de depósito de FERM-P No. 3992; en "Instituto de Fermentación", Osaka (IFO), Japón , bajo el número de catálogo de IFO 13726 y en "The American Type Culture Collection" (ATCC), Maryland, Estados Unidos, bajo el número de catálogo de ATCC-31281.

5 Aun cuando es un microorganismo del género - Nocardia es propenso, como lo son los microorganismos en general, a sufrir variaciones y mutaciones, tanto espontánea como artificialmente. Por ejemplo, las muchas variantes de la cepa que pueden obtenerse por irradiación con ra
10 yos X, rayos gamma, luz ultravioleta, etc, por aislamiento de célula única, por cultivo en medios que contienen diversos compuestos químicos, o mediante cualquier otro tratamiento mutagénico, así como también los mutantes que proce
15 den espontáneamente de la cepa, no deben ser consideradas como representantes de otras especies distintas, sino que, más bien, cualquiera de tales variantes y mutantes capaz de producir C-15003 P-2, P-3, P-3' y/o P-4 puede ser utili
20 zada invariablemente para los fines de esta invención. A título de ejemplo, sometiendo la Cepa No. C-15003 a diversos tratamientos mutagénicos se obtienen mutantes que ado
25 lecen substancialmente de la capacidad de producir pigmentos solubles, mutantes con micelios de substrato que son incoloros, verde amarillento, pardo rojizo o rojo anaranjado, mutantes cuyas hifas están prestas a fragmentarse en
30 elementos bacilares o fragmentos de hifas cortos ramificados, y mutantes con abundantes micelios aéreos blancos o substancialmente sin micelios aéreos.

Pueden usarse en formas de derivados, valina y/o ácido isobutírico, como sustancias aditivas en la presen-

1 -te invención. Son ejemplos de los derivados ésteres tales
como ésteres alcohólicos que tienen de uno a 2 átomos de
carbono (por ejemplo éster metílico, éster etílico), de
los compuestos anteriores, amidas tales como amidas o al-
cohol amidas que tienen uno a 2 átomos de carbono (por
5 ejemplo N-metil amida, N-etil amida), de los compuestos
anteriores, sus ceto-ácidos (por ejemplo ácido α -cetoiso-
valérico), sales de los compuestos anteriores tales como
clorhidrato, sal de sodio, sal de potasio o sal de calcio.
La valina puede ser usada en su forma D, su forma L o su
10 forma DL. Las substancias aditivas anteriores pueden ser
mezclas de valina, ácido isobutírico y/o sus derivados.

En la práctica de esta invención, las substan-
cias antes citadas se añaden generalmente al medio en apro-
ximadamente 0,01 a 1,0% (P/V), de preferencia aproximada-
15 mente 0,1 a 0,5% (P/V), en cualquier momento del cultivo,
mientras se lleva a cabo el cultivo de Nocardia sp. No.
C-15003, preferiblemente en la etapa inicial del cultivo.

El medio empleado para el cultivo de tal cepa
que produce el antibiótico C-15003 P-3, puede ser cual-
quiera de medios líquidos y sólidos sólo si contiene subs-
20 tancias nutritivas que pueda utilizar la cepa. Para opera-
ciones de altas producciones se prefiere en general un me-
dio líquido. El medio puede comprender la substancia adi-
tiva usada en la presente invención, fuentes de carbono y
25 nitrógeno que la Cepa No. C-15003 pueda asimilar y subs-
tancias nutritivas, indicios, materia inorgánica, digesti-
ble, etc. Como ejemplos de dichas fuentes de carbono pue-
den citarse glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, dextrina,
30 almidón, glicerina, manitol, sorbitol, etc, grasas y acei-

1 tes (por ejemplo aceite de soja, grasa de cerdo, grasa de
pollo, etc) y así sucesivamente. Las fuentes de nitrógeno
pueden ser, por ejemplo, extracto de carne, extracto de le-
vadura, levadura desecada, harina de soja, líquido de ma-
cerado de maiz, peptona, harina de semilla de algodón, me-
5 lazas, urea, sales de amonio (por ejemplo sulfato de amo-
nio, cloruro de amonio, nitrato de amonio etc.), sales ni-
trato (por ejemplo nitrato de sodio, nitrato de potasio).
El medio puede contener además sales de sodio, potasio,
calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobalto, níquel,
10 etc., sales de ácido fosfórico, ácido bórico, etc. Además,
el medio puede contener, según sea necesario, vitaminas
(por ejemplo B₁, B₂, ácido nicotínico, B₁₂, C, E, etc.).
ácidos nucleicos (por ejemplo purina, pirimidina y sus de-
rivados) y así sucesivamente. Con el fin de ajustar el pH
15 del medio puede añadirse un ácido mineral y/o un metal al-
calino o amoniaco así como también las bases correspondien-
tes como agentes de ajuste del pH. Además pueden añadirse
al medio, si se desea, aceites y grasas, agentes tenso-
activos y antiespumantes.

20 El cultivo puede llevarse a cabo mediante cual-
quiera de las condiciones, estacionaria, en agitación,
aerobio sumergido y otras condiciones de cultivo. Para
operaciones de alta producción se prefiere, como es lógi-
co, el cultivo sumergido. Aun cuando las condiciones de
25 cultivo dependen, naturalmente, de las condiciones de la
fermentación y de la composición del medio, la cepa usa-
da, el método de cultivo y otros factores, se prefiere
normalmente llevar a cabo la incubación a una temperatura
30 entre 20 y 35°C con un pH inicial de aproximadamente 5,5 -

1 - 8,5 o cosa así, en particular desde 23 a 30°C con un
pH inicial de 6,5 a 7,5. Aun cuando el tiempo de cultivo
es también variable según los mismos factores citados, es
aconsejable continuar el cultivo hasta que la potencia de
P-3, se hace máxima. En el caso de cultivo en agitación o
5 cultivo sumergido aerobio en medio líquido, el tiempo re-
querido normalmente oscila entre aproximadamente 48 y 240
horas.

Lo siguiente es un ejemplo concreto del método
para producir P-3. Se inoculó la Cepa No. C-15003 en un
10 medio de cultivo (I) compuesto de 3% de almidón soluble,
0,2% de cloruro de amonio, 0,05% de sulfato de magnesio,
1,09% de dihidrógenofosfato de potasio, 2,09 % de hidróge-
nofosfato dipotásico, 0,001 % de sulfato ferroso y la subs-
tancia aditiva, o un medio de cultivo (II) compuesto de
15 5% de dextrina, 3% de líquido de macerado de maiz, 0,1%
de peptona, 0,5% de carbonato de calcio y la substancia
aditiva, y se cultivó a 28°C durante 144 horas en un agi-
tador giratorio (200 r.p.m.) o un fermentador.

Las Tablas 4 y 5 muestran los resultados obteni-
20 dos usando los medios (I) y (II) respectivamente.

La potencia del C-15003 fue valorada mediante
el método del disco de papel con Talaromyces avellaneus
IFO 7721 como organismo de ensayo. El medio de valoración
estaba constituido por 3,5 g de hidrógenofosfato disódico,
25 0,5 g de dihidrógenofosfato potásico, 5 g de extracto de
levadura (Difco U.S.A), 10 g de glucosa, 15 g de agar y
1000 ml de agua destilada (pH 7,0). La determinación de
P-2, P-3 y P-4 acumulados en el caldo de cultivo se efec-
30 tuó como sigue:

1 El caldo de cultivo se extrajo con un volumen
igual de acetato de etilo. La capa de disolvente se con-
centró y se secó. La materia seca se disolvió con acetato
de etilo para dar un volumen 1/100 del caldo de partida.
5 Los productos fueron desarrollados sobre una placa de gel
de sílice 60F²⁵⁴, Merck, Alemania Occidental, para cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice, con acetato
de etilo saturado de agua. La cantidad de antibiótico y
la proporción de los componentes fueron determinadas me-
diante un explorador de CCD de doble longitud de onda
10 Shimazu modelo CS-910 (Shimazu, Ltd., Japón) sobre la ba-
se de las densidades integrales de cada una de las manchas
existentes sobre el cromatograma, a 254 nm. La proporción
de los componentes fue representada como tanto por ciento
peso en peso en los productos totales, P-2, P-3 y P-4.

15 Como se indica en las Tablas 4 y 5, la Cepa No.
C-15003 produjo el antibiótico P-3 en la proporción del
90% o más del total, en presencia de los aditivos especí-
ficos, pero 65% o menos en ausencia de tales compuestos.
Por consiguiente, la recuperación del P-3 del caldo de
20 cultivo se hace más eficazmente en el primer caso que en
el último.

25

30

1
5
10
15
20
25
30

Tabla 4

| Substancia aditiva | Cantidad de adición (%) | Tiempo de adición (horas)* | Proporción de componentes (% P/P) | | | Potencia total (μ g/ml) |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|-----|-----|------------------------------------|
| | | | P-2 | P-3 | P-4 | |
| Nada | - | - | 10 | 65 | 25 | 10 |
| L-valina | 0,1 | 0 | 1 | 95 | 4 | 16 |
| L-valina | 0,3 | 0 | 1 | 97 | 2 | 26 |
| L-valina | 0,1 | 72 | 2 | 95 | 3 | 10 |
| D-valina | 0,1 | 0 | 2 | 95 | 3 | 16 |
| Isobutirato de sodio | 0,01 | 0 | 1 | 91 | 8 | 8 |

* Tiempo cero significa que la substancia aditiva se añadió al medio como uno de los ingredientes.

Tabla 5

| Substancia aditiva | Cantidad de adición (%) | Tiempo de adición (horas)* | Proporción de componentes (% P/P) | | | Potencia total (/ug/ml) |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|-----|-----|--------------------------------|
| | | | P-2 | P-3 | P-4 | |
| Nada | - | - | 15 | 60 | 25 | 18 |
| L-valina | 0,1 | 0 | 5 | 90 | 5 | 15 |
| L-valina | 0,3 | 0 | 3 | 94 | 3 | 15 |
| L-valina | 0,5 | 0 | 2 | 96 | 2 | 13 |
| L-valina | 0,3 | 48 | 3 | 94 | 3 | 13,5 |
| Isobutirato de sodio | 0,3 | 0 | 5 | 92 | 3 | 11 |

Nota: * Tiempo cero tiene el mismo significado que la Nota de la Tabla 4

1 Debido a que el P-3, que se produce de este modo
en el caldo de cultivo, es una substancia neutra lipófila,
puede ser recuperado convenientemente del caldo de cultivo
por procedimientos de separación y purificación que se em-
plean habitualmente para la recuperación de tales metaboli-
5 tos microbianos. El P-3 se extrae fácilmente del filtrado
de cultivo con disolventes orgánicos inmiscibles con agua
tales como ésteres de ácidos grasos, por ejemplo acetato
de etilo y acetato de amilo; alcoholes, por ejemplo buta-
nol; hidrocarburos halogenados, por ejemplo diclorometano,
10 cloroformo; y cetonas, por ejemplo metil isobutil cetona.
La extracción del P-3 del filtrado se lleva a cabo a un
pH casi neutro, preferiblemente con acetato de etilo a
pH 7. El extracto se lava con agua y se concentra a pre-
sión reducida. Después, se añade al concentrado un disol-
15 vente no polar tal como éter de petróleo o hexano y se re-
cupera como un precipitado el producto crudo que contiene
los compuestos activos. El producto crudo se somete suce-
sivamente a procedimientos de purificación convenientes,
si se desea. Así, como un procedimiento de purificación
20 rutinario, es útil la cromatografía de adsorción y para
este fin, puede emplearse uno de aquellos adsorbentes co-
munes tales como gel de sílice, alúmina activada, resina
adsorbente no iónica macroporosa, etc. El P-3 en el pro-
ducto crudo se desarrolla en tal cromatografía en gel de
25 sílice con, por ejemplo, éter de petróleo y hexano y se
eluye mediante la adición de un disolvente polar tal como
acetato de etilo, acetona, etanol o metanol, o un hidrocar-
buro halogenado tal como diclorometano o cloroformo, con-
30 teniendo un disolvente polar tal como un alcohol, p.e. me-

1 - tanol o etanol, una cetona, p.e. acetona o metil etil cetona, o semejante. De este modo se eluye el P-3 se separa y se recupera.

5 En el caso de que se use una resina adsorbente macroporosa para la purificación de P-3, la elución del P-3 desde la columna se consigue con una mezcla de agua con un alcohol inferior, una cetona inferior o un éster. El alcohol inferior puede ser, por ejemplo, metanol, etanol, propanol o butanol, etc., y la cetona inferior puede ser, por ejemplo, acetona o metil etil cetona, etc. El
10 éster puede ser, por ejemplo acetato de etilo o acetato de butilo, etc. En un procedimiento típico, el producto crudo se disuelve en metanol-agua al 60% y se adsorbe sobre una columna de Diaion HP-10 (Mitsubishi Chemical Industries, Ltd., Japón). La columna se lava con metanol-
15 -agua al 70% y se eluye el P-3 con metanol-agua al 90%.

En el procedimiento antes descrito, las fracciones que contienen P-3 se reúnen y concentran a presión reducida. Al producto seco se añaden de 5 a 8 volúmenes de acetato de etilo y se deja en reposo la mezcla, de donde
20 de cristaliza el P-3.

En el método de la presente invención, la proporción de producción de P-3 en los productos C-15003 alcanza 90% o más y se recupera fácilmente el P-3 del caldo de cultivo. Por consiguiente, el método de la presente invención es muy ventajoso para la producción industrial de
25 P-3.

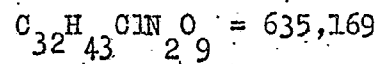
Las propiedades físico-químicas del P-3 obtenido en el Ejemplo 4 se muestran en la Tabla 6.

30

1

Tabla 6

Antibiótico C-15003 P - 3.



5

10

15

20

25

| | |
|--|--|
| Punto de fusión (°C) | 190 - 192° |
| Rotación específica α_D^{22} (C=0,375 CHCl ₃) | -136° ± 10° |
| Análisis elemental Encontrado (%) | C 60,06 H 7,04 N 4,33 Cl 5,37 |
| Análisis elemental Calcd. (%) | C 60,51 H 6,82 N 4,41 Cl 5,58 |
| Espectro de absorción ultravioleta nm (ε) (en metanol) | 233(30250) 240(inflex. 28450) 252(27640) 280(5750) 288(5700) |
| Espectro de absorción infrarrojo (cm ⁻¹)KBr | 1740, 1730, 1670, 1580 1445, 1385, 1340, 1255 1180, 1150, 1100, 1080 1038 |

27118³⁰

| | | |
|----|---|--|
| 1 | Espectro de resonancia magnética nuclear (ppm) 100MHz en CDCl_3 | 1,27(d) (3H) 1,28(d) (3H) |
| 5 | Espectro de masas (m/e) | 573, 485, 470, 450 |
| 10 | Solubilidad | Insoluble en éter de petróleo, hexano y agua. Escasamente soluble, en benceno y éter. Soluble en cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol, piridina, tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido. |
| 15 | Reacciones de color | Dragendorff: Positiva Beilstein: Positiva |

20 Se supone que el P-3, P-3' y P-4 son compuestos nuevos, pero P-2 es el mismo compuesto que el propionato de maytansinol que se indica en el informe de Kupchan y otros (The Journal of the American Chemical Society, 97, 5294 (1975) en términos de análisis elemental, rotación específica, absorción de rayos ultravioleta, absorción de rayos infrarrojos, espectro de masas y así sucesivamente.

25 La actividad biológica del P-3 es como sigue:

A) Acción antimicrobiana:

30 Con tripticasa-soya agar (BBL) como medio de valoración, las concentraciones inhibitorias contra los micro

1 —organismos que se describen seguidamente fueron investiga-
das mediante el método del disco de papel. Discos de pa-
pel de filtro (Toyo Seisakusho, tipo delgado, 8 mm de diá-
metro) cada uno de ellos impregnado con 0,02 ml de una so-
lución de P-3 a 300 /ug/ml fueron colocados sobre placas
5 de agar inoculadas respectivamente con los microorganismos
que se describen a continuación. El P-3 no tuvo acción con-
tra las bacterias siguientes:

Escherichia coli, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis,
Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus
10 subtilis, Bacillus cereus, Klebsiella pneumoniae, Serratia
marcescens y Mycobacterium avium.

Por otra parte, el desarrollo de un hongo,
Talaromyces avellaneus es inhibido por P-3 sobre una pla-
ca de agar que consta de 3,5 g de hidrógenofosfato disódico,
15 0,5 g de dihidrógenofosfato monopotásico, 5 g de ex-
tracto de levadura (Difco), 10 g de glucosa, 15 g de agar,
1000 ml de agua destilada, pH 7,0. La concentración mínima
inhibitoria fue de 3 /ug/ml para el P-3.

Además, Tetrahymena pyriformis W como organis-
20 mo de ensayo fue cultivado sobre un medio de ensayo (con-
puesto por 20 g de Proteosapeptona (Difco), 1 g de extrac-
to de levadura, 2 g de glucosa, 1000 ml de agua destilada
y 10 ml de solución amortiguadora de fosfato LM, pH 7,0,
a 28°C, durante 44 a 48 horas y la actividad inhibitoria
25 del crecimiento del P-3 contra los protozoos fue determi-
nada mediante el método de dilución en serie. La inhibi-
ción del crecimiento tuvo lugar a 1 /ug/ml.

El P-3 tenía actividad contra los microorganismos
30 siguientes: Fusicladium levieri, Helminthosporium

1 - sigmoidium var. irregulare, Pyricularia oryzae, Cochlioborus miyabeanus, Sclerotinia sclerotiorum, Pellicularia sasakii, Trichophyton rubrum, Rhodotorula rubra y Cryptococcus neoformans.

5 B) Acción antitumoral

Se investigaron los efectos terapéuticos del P-3 (administrado por vía intraperitoneal durante 9 días consecutivos) sobre leucemia P388 en el ratón (1×10^6 células/animal, ratón, transplantado por vía intraperitoneal).

10 El P-3 tenía acción antitumoral tan alta como una proporción de prolongación de la duración de la vida de 163% al nivel de dosis de 0,00625 mg/kg/día.

C) Toxicidad

15 En un ensayo de toxicidad aguda preliminar en ratón como animal de ensayo, que llevó consigo la inyección intraperitoneal de P-3, este antibiótico mostro un valor de la DL_{50} superior a 0,313 mg/kg.

20 Como se ha mencionado anteriormente en esta Memoria, el P-3 tiene una fuerte acción inhibitoria contra hongos y protozoos y, por consiguiente, tiene valor como agente antifúngico y antiprotozoario. Además, debido a que el P-3 pone de manifiesto una acción de prolongación de la duración de la vida en animales mamíferos que tienen tumores (por ejemplo el ratón), es de esperar asimismo que
25 el compuesto pueda usarse como fármaco antitumoral.

30 El P-3, como agente antifúngico y antiprotozoario, puede ser usado con ventaja para una fijación de la ecología bacteriana en suelos, lodo activo, fluidos corporales animales o semejantes. Así, cuando han de aislarse de

1 -muestras de suelo bacterias valiosas o cuando las accio-
nes de bacterias han de ser evaluadas independientemente
de/las de hongos y protozoos en relación con la operación
y análisis de un sistema de lodo activo usado en el trata-
5 miento de agua residual, el antibiótico presente puede ser
utilizado para obtener un crecimiento selectivo de la flo-
ra bacteriana sin permitir el desarrollo de los hongos y
protozoos que acompañan al espécimen. En un caso típico,
la muestra se añade a un medio líquido o sólido y se aña-
de 0,1 ml de una solución de 10 a 100 /ug/ml de P-3 en me-
10 tanol-agua al 1% por ml del medio, que después es incuba-
do.

También puede usarse el P-3 como agente antimicrobiano para el tratamiento de enfermedades de plantas ocasionadas por los microorganismos mencionados anterior-
15 mente. En la aplicación típica se usa P-3 en forma de una solución acuosa metanólica que contiene 0,5 /ug/ml -
5 /ug/ml del antibiótico. Por ejemplo puede usarse P-3 para controlar el añublo, la mancha de la hoja de Helminthosporium y de la roya en vaina de las plantas de arroz.

20 Los ejemplos siguientes son ilustrativos además para explicar en detalle la presente invención, en donde "parte(s)" se basa en peso a menos que se indique de otro modo y la relación entre "parte(s)" y "parte(s) en volumen" corresponde a la existente entre "gramo(s)" y "mili-
25 litro(s)" y "%" se basa en "peso/volumen" a menos que se indique de otro modo.

1

Ejemplo 1

5

Cuarenta partes en volumen de medio de cultivo de siembra (1,0% de glucosa, 2,0% de Bactotripton y 1,2% de Bacto-extracto de levadura, pH 7,0) se vierte en 200 partes en volumen en un matraz erlenmeyer.

10

Después de esterilización, se inocula en el medio Nocardia sp. No. C-15003 (IFO 13726; ATCC 31281; FERM-P no. 3992). El inoculante se incubó a 28°C en un agitador giratorio (200 r.p.m.) para dar un cultivo de siembra.

15

Las células en el cultivo se lavan tres veces con agua destilada esterilizada, y las células lavadas se vuelven a suspender en el volumen de caldo original de agua destilada esterilizada. Una parte en volumen de lo anterior fue inoculada en 40 partes en volumen de medio de cultivo principal constituido por 3% de almidón soluble, 0,2% de cloruro de amonio, 0,05% de sulfato de magnesio, 1,09% de dihidrógenofosfato potásico, 2,09% de hidrógenofosfato dipotásico, 0,001% de sulfato ferroso y 0,1% de L-valina y el cultivo principal se efectuó a 28°C durante 8 días en el agitador giratorio (200 r.p.m.).

20

25

La cantidad de producción total de C-15003 fue de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y la proporción de P-3 en el total era del 95% (P/P).

1

Ejemplo 2

5

10

500 partes en volumen del cultivo de siembra indicado en el Ejemplo 1 fueron inoculadas a 2.000 partes en volumen de un matraz Sakaguchi y se cultivó a 28°C durante 48 horas en un agitador de vaivén (110 carreras/min.) para dar un inoculum. El inoculum se hizo pasar a 100×10^3 partes en volumen de un medio constituido por 2,0% de glucosa, 3,0% de almidón soluble, 1,0% de líquido de macedado de maiz, 1,0% de harina de soja, 0,5% de polipeptona (Daigo Nutritive Chemicals, Ltd., Japón), 0,3% de cloruro de sodio y 0,5% de carbonato de calcio, pH 7,0, en 200×10^3 partes en volumen de un fermentador de acero inoxidable.

15

20

El cultivo se efectuó a 28°C durante 48 horas bajo 100×10^3 partes en volumen/minuto de aireación y 200 r.p.m. de agitación. El caldo de cultivo (10×10^3 partes en volumen) se hizo pasar a 100×10^3 partes en volumen de un medio de fermentación (5% de dextrina, 3% de líquido de macerado de maiz, 0,1% de peptona, 0,3% de L-valina y 0,5% de carbonato de calcio, (P/V), pH 7,0) que estaba en 200×10^3 partes en volumen del fermentador de acero inoxidable. El cultivo fue llevado a cabo a 28°C durante 4 días bajo 100×10^3 partes en volumen/minuto de aireación, 150 r.p.m. de agitación.

25

La cantidad total de producción de C-15003 fue de 12 μ g/ml, y el P-3 en el C-15003 era aproximadamente de 98% (P/P).

30

27118

1

Ejemplo 3

A 95×10^3 partes en volumen del caldo de cultivo obtenido en el Ejemplo 2 se añaden 50×10^3 partes en volumen de acetona. La mezcla se agita durante 30 minutos.

5 A la mezcla que resulta se añaden 2×10^3 partes de Hyflo Super-Cel (Johnes and Manville Products, Ltd.) y la mezcla se agita bien. La mezcla se filtró con un filtro de presión proporcionando 135×10^3 partes en volumen de filtra

10 do. Al filtrado se añadieron 50×10^3 partes en volumen de agua y 90×10^3 partes en volumen de acetato de etilo, y la mezcla se agitó y extrajo dos veces. Las capas de acetato de etilo obtenidas fueron reunidas y lavadas dos veces con agua, de 80×10^3 partes en volumen de cada una. A la capa de acetato de etilo obtenida se añadió 1×10^3

15 partes de sulfato de sodio anhidro, se secó y se concentró a 200 partes en volumen. Al concentrado se añadió éter de petróleo, y el precipitado obtenido se recuperó mediante filtración obteniéndose 35 partes del producto crudo.

20 Al producto crudo obtenido de este modo se añadieron 50 partes en volumen de acetato de etilo y se agitó la mezcla. La porción insoluble fue separada por filtración y al filtrado se añadieron 10 partes de gel de sílice (Merck, Alemania Occidental, 0,05 a 0,2 mm). Después de agitar la mezcla, se separó el acetato de etilo por destilación a presión reducida.

25

30 El residuo se aplicó a la parte superior de una columna de gel de sílice (500 partes en volumen). Los antibióticos fueron eluidos por etapas con 500 partes en volumen de n-hexano, 500 partes en volumen de una mezcla de

1 n-hexano-acetato de etilo (3:1), 2.000 partes en volumen de una mezcla de n-hexano-acetato de etilo (1:1), y 2.000 partes en volumen de acetato de etilo saturado de agua, y los eluatos fueron recogidos en fracciones de 50 partes en volumen cada una.

5 Una porción de una parte en volumen de cada fracción se concentró a sequedad, y se añadió 0,1 parte en volumen de acetato de etilo al concentrado para dar una mezcla. La mezcla se colocó en forma de mancha a 2,5 cm del borde del lado inferior de una placa de vidrio con gel de sílice (Merck, Alemania Occidental, 60 F₂₅₄, 0,25 mm, - 10 20 x 20) y se desarrolló aproximadamente 17 cm con acetato de etilo saturado de agua. Después del desarrollo se llevó a cabo la detección con luz ultravioleta (2537 Å). Las fracciones activas de R_f 0,42 fueron recogidas y concentradas a presión reducida a aproximadamente 2 partes en volumen. 15 A este concentrado se añadieron 20 partes en volumen de éter de petróleo obteniendo 9,1 partes de cristales de crudo. Los cristales de crudo se disolvieron en 20 partes en volumen de acetato de etilo caliente. Después de enfriar se recuperaron 0,85 partes de cristales de P-3. La pureza de los cristales de P-3 obtenidos era de 97% (P/P), y su punto de fusión era 189 a 190°C. 20

Ejemplo 4

25 En 400 partes en volumen de metanol al 50 % se disolvieron 20 partes del producto crudo obtenido en el Ejemplo 3. Se rellenó una columna de 2,5 cm de diámetro con 1.000 partes en volumen de Diaion HP-10 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd., Japón) con 3.000 partes en volu 30

1 men de metanol-agua al 50%. La solución de muestra ante-
riormente preparada se hizo pasar a través de la columna
y se lavó con 1.000 partes en volumen de metanol al 60%,
y la elución del gradiente se efectuó continuamente, emplean-
do 7.500 partes en volumen de metanol-agua al 60% y 7.500
5 partes en volumen de metanol-agua al 95%.

El eluato se recogió en fracciones de 75 partes
en volumen y cada fracción se aplicó en la cromatografía
de capa delgada en gel de sílice, descrita en el Ejemplo 3.

10 Las fracciones activas Nos. 145 a 153 fueron re-
cogidas y concentradas. Al concentrado se añadieron 500
partes en volumen de agua y 1.000 partes en volumen de
acetato de etilo.

15 La mezcla se agitó en un embudo de separación y
se separó la capa de agua, y después de lavar dos veces
con 300 partes en volumen de agua, se secó sobre sulfato
de sodio anhidro la capa de acetato de etilo, se concen-
tró y dejó en reposo.

20 Los cristales de P-3 resultantes fueron recogi-
dos por filtración y secados (0,880 partes de P-3). La pu-
reza de los cristales de P-3 obtenidos fue de 95% P/P y
su punto de fusión era 188 a 190°C.

Ejemplo 5

25 Se usa en lugar de la L-valina del Ejemplo 1
éster metílico de valina, éster N-metílico de valina, clor-
hidrato de valina, ácido α -cetoisovalérico, éster metíli-
co del ácido isobutírico, éster N-metílico del ácido iso-
butírico o una mezcla de valina y ácido isobutírico, con
30 lo que se obtienen resultados similares, es decir, la -
producción específica del P-3 objeto de la invención.

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan 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 mejorado para producir antibiótico C-15003 P-3 cultivando un microorganismo que pertenece al género Nocardia y que es capaz de producir el antibiótico C-15003 P-3 en un medio de cultivo que contiene fuentes de carbono asimilable y fuentes de nitrógeno digestible, que comprende incorporar valina, ácido isobutírico y/o sus derivados, como sustancias aditivas, al medio de cultivo.

15

2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que el microorganismo es Nocardia sp. No.C-15003 (ATCC-31281; IFO 13726; FERM-P No.3992).

20

3ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que la sustancia aditiva comprende valina y/o ácido isobutírico.

4ª.- "UN METODO MEJORADO PARA PRODUCIR ANTIBIOTICO C-15003 P-3".

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

25

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

Madrid, 30. NOV. 1978

P.A.

Fernando de Elzaburu
Por Poder.

27118

30