

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

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

(19) ES	(11) NUMERO 480.405	(10) A1
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION 9 Mayo 1979	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO 54373/78 24788/79	(32) FECHA 10-5-1978 2-3-1979	(33) PAIS Japón "
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C07G 11/00; C12D9/22 A31K 35/06	(52) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
(54) TITULO DE LA INVENCION "UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS O SUS DERIVADOS"		
(71) SOLICITANTE (S) TOYO JOZO COMPANY, LTD. (MFP-1523 TOYO)		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 632-1, Ohitocho-Mifuku, Tagata-gun, Shizuoka, Japón		
(72) INVENTOR (ES) Masaru OTANI, Shuzo SATOI, Naoki MUTO, Tetsu SAITO, Tadashiro FUJII y Seiji KATSUMATA		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-71.872)		

jga

1 Esta invención se refiere a nuevas sustancias
antibióticas macrólidas, que muestran unas excelentes acti-
vidades antibacterianas y antimicoplasmales contra microor-
ganismos tales como Staphylococcus o Mycoplasma, a procedi-
5 mientos para producir los mismos y al microorganismo para
la producción de dichas sustancias.

En los dibujos que se acompañan:

La figura 1 y la figura 2 muestran los espectros
de absorción infrarroja de las nuevas sustancias antibióti-
cas de la presente invención A 11725 I y II, respectivamen-
10 te;

la figura 3 y la figura 4, los espectros de absor-
ción ultravioleta de las sustancias antibióticas A 11725 I
y II, respectivamente;

15 la figura 5 y la figura 6, los espectros de reco-
nancia magnética nuclear de las sustancias antibióticas
A 11725 I y II, respectivamente;

la figura 7, el espectro de absorción ultravioleta
de la sustancia antibiótica A 11725 III;

20 la figura 8, el espectro de absorción infrarroja
de la sustancia antibiótica A 11725 III;

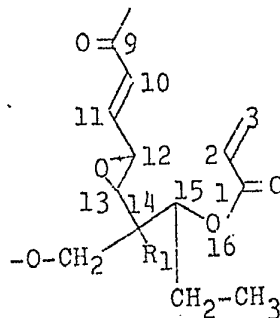
la figura 9, el espectro de resonancia magnética
nuclear de la sustancia antibiótica A 11725 III.

25 Se encuentra que las sustancias antibióticas
A 11725 I, II y III, proporcionadas por la presente inven-
ción, tienen las propiedades fisicoquímicas que se muestran
en la Tabla 1.

30 Por estas diversas propiedades, se juzga que los
presentes compuestos son sustancias antibióticas que per-
tenecen al grupo de los macrólidos básicos. Como ninguno

1 de estos compuestos son conocidos en la técnica, se juzga
que cada uno de estos compuestos es un compuesto nuevo.

Más específicamente, aunque sus fórmulas estruc-
turales no son todavía conocidas con precisión, han sido
5 hasta ahora dilucidadas algunas características específicas
de estos compuestos, estimadas a partir del análisis de los
datos comparados con aquellos de compuestos conocidos. A
saber, todos estos compuestos son sustancias de tipo macró-
lido, cíclicas, de 16 miembros, que tienen unidos a dicho
10 sacárido cíclico, grupos de desosamina y 6-desoxi-2,3-di-o-
-metil-hexosa (a excepción de la sustancia A 11725 III,
que tiene desosamina y 6-desoxi-(2 ó 3)-o-metil-hexosa, res-
pectivamente. No hay ningún grupo aldehído unido en las mo-
léculas de estos compuestos. Además, se estima que los anti-
15 bióticos A 11725 I y II tienen la siguiente estructura par-
cial



25 en la que R_1 es un átomo de hidrógeno en el caso del anti-
biótico A 11725 I, y un grupo hidroxilo en el caso del anti-
biótico A 11725 II. Se estima, también, que el antibiótico
A 11725 III, tiene la siguiente estructura parcial:

1

5

10

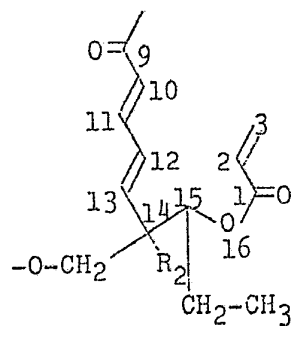
15

20

25

30

3089



en la que R_2 es un átomo de hidrógeno.

30

1

Tabla 1

		A 11725 <u>I</u>	A 11725 <u>II</u>	A 11725 <u>III</u>
Aspecto:		Polvos blancos	Polvos blancos	Polvos blancos
5	Fórmula molecular:	$C_{37}H_{61}NO_{12}$	$C_{37}H_{61}NO_{13}$	$C_{36}H_{59}NO_{11}$
	Análisis elemental:			
	Encontrado:	C 62,34	60,57	63,25
		H 9,25	8,95	9,01
10		N 1,96	1,96	2,10
	Calculado:	C 62,43	61,05	63,41
		H 8,64	8,44	8,72
		N 1,97	1,92	2,05
	Peso molecular (determinado por espectro de masas):	711	727	681
15	Punto de fusión (o punto de descomposición):	103-107°C	102-106°C	99-102°C
	$[\alpha]_D$:	-40,0° (C=1, metanol)	-31,0° (C=1, metanol)	-2,3° (C=1,0, metanol)
20	Espectro de absorción ultravioleta:	Fig. 3 (25 γ /ml, en metanol)	Fig. 4 (25 γ /ml, en metanol)	Fig. 7 (28 γ /ml, en metanol)
		λ máx 217mm ($E_{1cm}^{1\%}$ = 340)	λ máx 217mm ($E_{1cm}^{1\%}$ = 337)	λ máx 216mm ($E_{1cm}^{1\%}$ = 310)
25		λ máx 240mm (in. 180)	λ máx 240mm (in. 180)	λ máx 283mm ($E_{1cm}^{1\%}$ = 310)
	Espectro de absorción infrarroja (método KBr):	Figura 1 (que tiene bandas de absorción a longitudes de onda de alrededor de	Figura 2 (que tiene bandas de absorción a longitudes de onda de alrededor de	Figura 8 (que tiene bandas de absorción a longitudes de onda de alrededor de
30				

1

Tabla 1 (continuación)

	<u>A 11725</u> <u>I</u>	<u>A 11725</u> <u>II</u>	<u>A 11725</u> <u>III</u>
5	3440,2960	3460,2960	3600,2970
	2920,2875	2930,2880	2930,2880
	2845,2780	2830,2780	1710,1675
	1715,1685	1715,1690	1645,1590
	1650,1645	1645,1620	1460,1380
10	1620,1460	1455,1375	1350,1320
	1375,1355	1350,1325	1275,1230
	1325,1275	1270,1255	1170,1070
	1255,1230	1230,1165	1050,980
	1170,1110	1110,1075	960,930
15	1080,1045	1040,980	835,
	980,955	955,930	750 cm ⁻¹)
	930,885	885,855	
	855,	830 cm ⁻¹)	
	830 cm ⁻¹)		
20	Resonancia magnética nuclear (CDCl ₃ , 100 MHz, TMS): ³	Fig. 5	Fig. 6
	GCD		Fig. 9
	gel de sílice (Merk Co. Nº 5714):		
	CHCl ₃ : metanol (5:1):	0,48	0,40
25	CHCl ₃ : metanol: amoníaco al 7% (40:12:20, capa inferior):	0,72	0,56
	Metanol:	-	0,31
	Benceno: acetona (1:1):	-	0,05
30	n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1):	-	0,59

3089

1

Tabla 1 (continuación)

	A 11725 <u>I</u>	A 11725 <u>II</u>	A 11725 <u>III</u>
Reacción de coloración:			
5 Decoloración de solución de permanganato potásico acuosa:	+	+	+
10 Reacción de ninhidrina, reacción de Sakagushi, reacción de cloruro férrico:	-	-	-
Naturaleza ácida o básica:	Básica	Básica	Básica
15 Solubilidad:	Soluble en agua ácida y en disolventes orgánicos, tales como metanol, acetona, acetato de etilo, benceno, etc.; difícilmente soluble en agua básica	Similar a A 11725 I	Soluble en agua ácida, metanol, acetona, acetato de etilo y benceno; difícilmente soluble en agua básica; insoluble en hexano

20

Se encuentra también, que las sustancias antibióticas de la presente invención tienen los espectros antibacterianos y antimicoplasmiales que se muestran en la Tabla 2, determinados mediante el método de dilución de agar.

25

Las sustancias proporcionadas por la presente invención pueden ser utilizadas en forma de sales farmacéuticamente aceptables y generalmente utilizadas, como ácidos minerales, ácidos orgánicos, etc., por ejemplo, sales de ácido tartárico, sales de ácido cítrico, sales de ácido succínico y similares.

30

1 Las sustancias antibióticas de la presente in-
vención pueden ser administradas por vía oral, en forma de
tabletas y polvos o, alternativamente también, por medio de
inyección intravenosa. La dosificación puede ser suficien-
5 te con aproximadamente 400 a 2.000 mg por ser humano adul-
to y por día, para que sea eficaz contra dolencias infec-
ciosas respiratorias provocadas por microorganismos gram-po-
sitivos, tales como Staphylococcus. Cuando se determina la
toxicidad de las sustancias antibióticas de la presente
10 invención, se encuentra que la DL_{50} en el caso del ratón
es tanto como de 2.000 mg o más, por administración oral.
Las presentes sustancias pueden ser utilizadas también como
sustancias antibióticas para añadir a los forrajes, y como
sustancias antibióticas para la terapia de animales.

15

20

25

30

3089

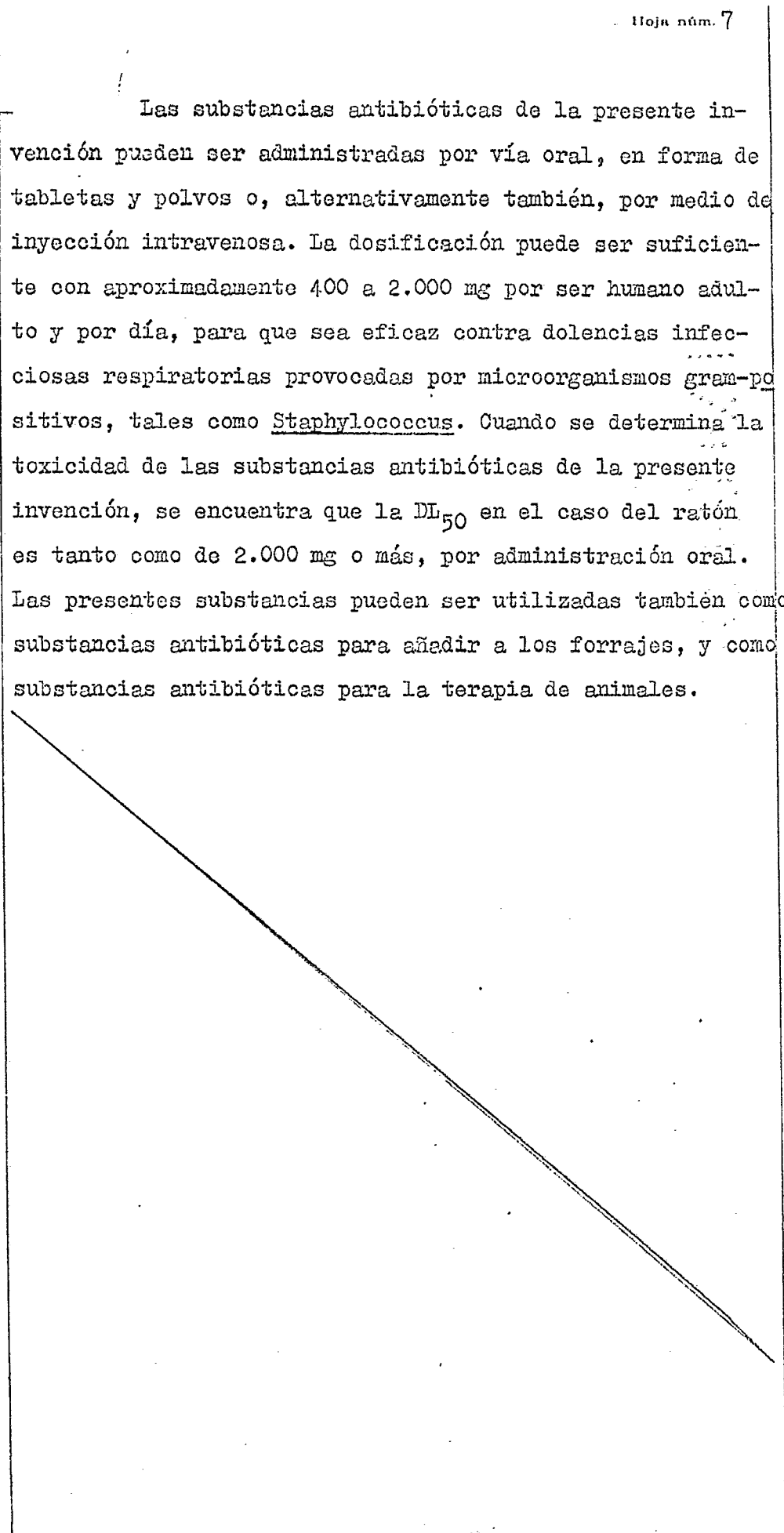


Tabla 2

Mínima concentración inhibidora del crecimiento, microgramos/ml

	10 ⁸	A 11725 I	A 11725 II	A 11725 III
5	<u>Microorganismos de ensayo xl</u>			
	1. <u>Staphylococcus aureus</u> (ATCC 6538 P)	0,2	0,2	0,2
	2. " (MS 353)	0,2	0,2	0,2
	3. " (MS 353 C36)	≤ 0,05	0,1	0,2
10	4. <u>Staphylococcus aureus</u> (MS 353 A0)	>100	>100	>100
	5. " (0116)	>100	>100	100
	6. " (0119)	>100	>100	>100
	7. " (0126)			
15	8. " (0127)	>100	>100	>100
	9. <u>Staphylococcus epidermidis</u> (s.p.-al-1)	0,1	0,1	0,1
	10. <u>Streptococcus pyogenes</u> (N.Y.5)	≤ 0,05	≤ 0,05	0,1
	11. " (1022)	>100	>100	>100
20	12. <u>Streptococcus faecalis</u> (1501)	>100	>100	>100
	13. <u>Streptococcus agalactiae</u> (1020)	12,5	6,3	25
	14. <u>Sarcina lutea</u> (ATCC 9341)	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05
25	15. <u>Micrococcus flavus</u> (ATCC 10240)	≤ 0,05	0,2	≤ 0,05
	16. <u>Corynebacterium diphtheriae</u> (P.W.8)	0,4	0,4	3,1
	17. <u>Bacillus subtilis</u> (ATCC 6633)	0,4	0,4	1,6
30	18. <u>Escherichia coli</u> (NIHJ-JC2)	>100	>100	>100

1

Tabla 2 (continuación)

Mínima concentración inhibidora del crecimiento, microgramos/ml

Microorganismos de ensayo	10^8 xl	A 11725	A 11725	A 11725
		I	II	III
19. <u>Escherichia coli</u> (B)		100	25	>100
20. <u>Klebsiella pneumoniae</u> (ATCC 10031)		25	25	100
21. <u>Salmonella typhosa</u> (E 901)		>100	>100	>100
22. <u>Salmonella enteritidis</u> <u>gertner</u>		>100	>100	>100
23. <u>Shigella flexneri</u> type 3a		100	50	>100
24. <u>Shigella sonnei</u> (E 33)		>100	>100	>100
25. <u>Proteus vulgaris</u> (OX19)		100	50	100
26. <u>Serratia marcescens</u>		>100	>100	>100
27. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> (IAM 1095)		>100	>100	>100
28. <u>Mycoplasma gallisepticum</u>		0,006	0,03	
29. <u>Mycoplasma synoviae</u>		0,03	0,8	

20

25

30

3089

Las sustancias antibióticas de acuerdo con la presente invención pueden ser producidas por un método biológico. En la presente invención se utiliza un actinomiceto que pertenece al género Micromonospora, que se denomina "Micromonospora sp. A 11725" y que ha sido aislada del suelo, en una plantación de patatas de Unazuki-cho, Shimoshin-kawa-gun, prefectura de Toyama, Japón (FERM-P Nº 4488, depositada en el Instituto de Investigaciones sobre Fermentación, Oficina de la Industria y Tecnología, Japón; NRRL

1 -11452, depositada el 21 de Marzo de 1979).

El microorganismo que ha de ser utilizado en la presente invención, tiene las siguientes propiedades microbiológicas:

5

I: Propiedades morfológicas

El micelio de substrato es alargado, ondulado, ramificado de manera sencilla, de un diámetro de 0,6 a 0,8 micras, sin que se observe fragmentación del micelio. Se forma una espora por cada esporófero corto, en su punta que crece del micelio substrato, siendo dicha espora de forma esférica a oval, con un tamaño de 1,0 a 1,5 micras, teniendo salientes en forma de espina, lo que le hace adoptar un aspecto similar a los confetti. Sobre medio de agar, dependiendo de su composición, puede formarse algunas veces un micelio aéreo achaparrado, o bien puede formarse una capa de esporas negras sobre la superficie de la colonia.

10

15

II. Crecimiento en diversos medios.

20

La Tabla 3 muestra los resultados de la observación efectuada sobre los productos cultivados en diversos medios, después de un cultivo a 30°C, durante 20 días. La indicación de los colores sigue la clasificación de colores de acuerdo con el Color Harmony Manual, 4ª edición, 1958, Container Corporation of America.

25

30

3089

Tabla 3

Crecimiento en diversos medios

Medio	Crecimiento	Color del micelio substrato	Capa de esporas	Micelio aéreo achaparrado	pigmento soluble
Agar de nitrato y sacarosa	Bueno	Cedro (61e) a rojo ladrillo (6ng)	Ninguna	Escaso; Rosa car- ne (5ca), Grisá- ceo a rosa amaril- lento moderado (5ec)	Rosa coral oscuro (6gc) a castaño ro- jizo (6ie)
Agar de glucosa- esparagina	Trazas a escaso	Rosa amarillento mo- derado (4gc)	Ninguna	Ninguno	Ninguno
Agar de glicerina- esparagina	Trazas	Rosa amarillento mo- derado (4gc) a rosa pardo (4ec)	Ninguna	Ninguno	Ninguno
Agar de fécula-sa- les inorgénicas	Moderado a bue- no	Fofo ladrillo (5ng) de humo (p)	Moderada; negro de humo (p)	Ninguno	Ninguno
Agar de tirosina	Trazas	Rosa pardo (3ec) a crudo (3gc)	Trazas; negro de humo (p)	Ninguno	Ninguno
Agar de harina de avena	Bueno a moderado	Fofo ladrillo (5ng) a pardo cobre (5pi)	Buena; negro de humo (p)	Ninguno	Tostado cobrizo (5ie) se forma alrededor de la colonia
Agar de levadura y malta	Bueno	Pardo rosa claro (7g) a pardo rosa (7ai)	Trazas; negro de humo (p)	Ninguno	Se forma ligeramente cedro (6le)
Agar de glucosa y extracto de leva- dura	Moderado	Pardo cacao (5lg) a castaño rojizo oscu- ro (6lg)	Escasa a tra- zas; negro de humo (p)	Trazas; rosa ma- risco (5ba)	Ninguno
Agar de glucosa y nitrato (Waksman Nº 1)*	Moderado a esca- so	Cedro (6,5le) a ro- jo ladrillo (6,5ng)	Ninguna	Ninguno	Ninguno
Agar nutritivo	Trazas	Inoloro a tostado claro (3gc)	Trazas; negro de humo (p)	Ninguno	Ninguno
Agar de Emerson (Waksman Nº 28)*	Bueno, rugoso	Cedro (6le-6,5le)	Ninguna	Ninguno	Ninguno
Agar de Bennett (Waksman Nº 30)*	Moderado a bue- no	Pardo rosa claro (7g) a pardo rosa (7ai)	Moderada; negro de humo (p)	Ninguno	Pardo rosa claro (7lg) a pardo rosa (7ni) se forma alrededor de la colonia
Agar de Kieck- Tresner (Waksman Nº 32)*	Bueno	Pardo cacao (5lg)	Ninguna	Escaso; rosa per- do (4ec)	Cedro (6lg) se forma alrededor de la colo- nia

Tabla 3

Crecimiento en diversos medios

	<u>Medio</u>	<u>Crecimiento</u>	<u>Color del micelio substrato</u>	<u>Capa de espor</u>
5	Agar de nitrato y sacarosa	Bueno	Cedro (61e) a rojo ladrillo (6ng)	Ninguna
	Agar de glucosa- esparraguina	Trazas a escaso	Rosa amarillento mo- derado (4gc)	Ninguna
10	Agar de glicerina- esparraguina	Trazas	Rosa amarillento mo- derado (4gc) a rosa pardo (4ec)	Ninguna
	Agar de fécula-sa- les inorgánicas	Moderado a bue- no	Rojo ladrillo (5ng)	Moderada; negro de humo (p)
	Agar de tirosina	Trazas	Rosa pardo (3ec) a crudo (3gc)	Trazas; negro humo (p)
15	Agar de harina de avena	Bueno a moderado	Rojo ladrillo (5ng) a pardo cobre (5pi)	Buena; negro ó humo (p)
	Agar de levadura y malta	Bueno	Pardo rosa claro (7g) a pardo rosa (7i)	Trazas; negro de humo (p)
20	Agar de glucosa y extracto de leva- dura	Moderado	Pardo cacao (5lg) a castaño rojizo oscu- ro (6lg)	Escasa a tra- zas; negro de humo (p)
	Agar de glucosa y nitrato (Waksman Nº 1)*	Moderado a esca- so	Cedro (6,5le) a ro- jo ladrillo (6,5ng)	Ninguna
	Agar nutritivo	Trazas	Incoloro a tostado claro (3gc)	Trazas; negro de humo (p)
	Agar de Emerson (Waksman Nº 28)*	Bueno, rugoso	Cetro (61e-6,5le)	Ninguna
25	Agar de Bennett (Waksman Nº 30)*	Moderado a bue- no	Pardo rosa claro (7g) a pardo rosa (7i)	Moderada; negro de humo (p)
	Agar de Hickey- Tresner (Waksman Nº 32)*	Bueno	Pardo cacao (5lg)	Ninguna

30

3089

Tabla 3

en diversos medios

<u>medio</u>	<u>Capa de esporas</u>	<u>Micelio aéreo achaparrado</u>	<u>pigmento soluble</u>
ojo	Ninguna	Escaso; Rosa carne (5ca), Grisáceo a rosa amarillento moderado (5ec)	Rosa coral oscuro (6gc) a castaño rojizo (6ie)
ojo mojado	Ninguna	Ninguno	Ninguno
ojo mojado rosa	Ninguna	Ninguno	Ninguno
5ng)	Moderada; negro de humo (p)	Ninguno	Ninguno
5) a	Trazas; negro de humo (p)	Ninguno	Ninguno
(5ng) (5pi)	Fuena; negro de humo (p)	Ninguno	Tostado cobrizo (5ie) se forma alrededor de la colonia
ro rosa	Trazas; negro de humo (p)	Ninguno	Se forma ligeramente cedro (6le)
lg) a oscuro	Escasa a trazas; negro de humo (p)	Trazas; rosa marisco (5ba)	Ninguno
a ro- ,5ng)	Ninguna	Ninguno	Ninguno
tado	Trazas; negro de humo (p)	Ninguno	Ninguno
le)	Ninguna	Ninguno	Ninguno
ro rosa	Moderada; negro de humo (p)	Ninguno	Pardo rosa claro (7lg) a pardo rosa (7ni) se forma alrededor de la colonia
lg)	Ninguna	Escaso; rosa pardo (4ec)	Cedro (6lg) se forma alrededor de la colonia

Tabla 3 (Continuación)

Medio	Crecimiento	Color del micelio substrato	Capa de esporas	Micelio aéreo achaparrado	pigmento soluble
Agar de fécula-NZ amina-extracto de levadura (ATCC N ^o 172)**	Buena	Vino oscuro (8pi) a vino malva (8ni)	Buena; negro de humo (p)	Ninguno	Vino viejo (8ng)
Agar de glucosa- NZ amina (1% de glucosa, 3% de NZ amina tipo A, 1,5% agar)	Moderado a escaso	Cedro (6le) a calde- ro (5le)	Ninguna	Ninguno	Ninguno
Agar de glucosa y peptona	Moderado	Pardo rosa (7ni) Moderada a escasa; negro de humo (p)	Ninguno	Vino viejo (7ng)
Rodajas de patata (Waksman N ^o 40)*	Ningún crecimien- to a trazas	Ninguno
Rodajas de patata + carbonato calci- co	Buena, rugosa	Pardo rosa oscuro: (7pn)	Moderada; negro de humo (p)	Ninguno	Pardo rosa oscuro (7pn) se forma. I.L- seramente
Agar de peptona- -levadura-hierro	Trazas a escaso	Tostado claro (6gc)	Trazas; negro de humo (p)	Ninguno	Ninguno

*) Waksman, S. A. "The Actinomycetes"
Vol. 2 1961 p. 327-334, Williams & Wilkins
Co.

**) The American Type Culture Collection,
Catalogue of Strains 18^a edic., 1968 p. 142

Tabla 3 (Continuación)

1
5
10
15
20
25
30
3089

<u>Medio</u>	<u>Crecimiento</u>	<u>Color del micelio substrato</u>	<u>Capa de esporas</u>
Agar de fécula-NZ amina-extracto de levadura (ATCC Nº 172)**	Bueno	Vino oscuro (8pi) a vino malva (8ni)	Buena; negro d humo (p)
Agar de glucosa- -NZ amina (1% de glucosa, 3% de NZ amina tipo A, 1,5% agar)	Moderado a escaso	Cedro (6le) a calde ro (5le)	Ninguna
Agar de glucosa y peptona	Moderado	Pardo rosa (7ni)	Moderada a esc negro de humo
Rodajas de patata (Waksman Nº 40)*	Ningún crecimien- to a trazas		
Rodajas de patata + carbonato cálc ico	Bueno, rugoso	Pardo rosa oscuro (7pn)	Moderada; negr de humo (p)
Agar de peptona- -levadura-hierro	Trazas a escaso	Tostado claro (6gc)	Trazas; negro humo (p)

*) Waksman, S. A. "The Actinomycetes"
Vol. 2 1961 p. 327-334, Williams & Wilkins
Co.

**) The American Type Culture Collection,
Catalogue of Strains 18ª edic., 1968 p. 142

3 (Continuación)

No	<u>Capa de esporas</u>	<u>Micelio aéreo achaparrado</u>	<u>pigmento soluble</u>
1) a)	Buena; negro de humo (p)	Ninguno	Vino viejo (8ng)
alde	Ninguna	Ninguno	Ninguno
).....	Moderada a escasa; negro de humo (p)	Ninguno	Vino viejo (7ng)
ró:.....	Moderada; negro de humo (p)	Ninguno	Pardo rosa oscuro (7pn) se forma ligeramente
6gc):.....	Trazas; negro de humo (p)	Ninguno	Ninguno

ns

1 III. Propiedades fisiológicas.

1) Capacidad de asimilación de fuentes de carbono:

5 Asimilable: D-arabinosa, D-glucosa, D-fructosa, D-mannosa, sacarosa, trehalosa, fécula.

Ligeramente asimilable: L-arabinosa, D-celobiosa, D-ribosa.

10 No asimilable: D-galactosa, β -lactosa, D-meleci-
tosa, α -melibiosa, rafinosa, L-ramnosa, L-sorbosa, D-xilo-
sa, glicerina, salicina, dulcita, inosita, D-mannita, D-sor-
bita, celulosa.

15 (Debido a que los presentes microorganismos sola-
mente pueden crecer escasamente sobre el medio de agar de
Pridham-Gottlieb que contiene D-glucosa, se utiliza como
medio basal un medio que contiene 0,5% de extracto de leiva-
dura y 1,5% de agar).

2) Intervalo de temperatura de crecimiento: 15-
45°C.

20 3) Licuación de gelatina: licuada en medio de
glucosa-peptona-gelatina.

4) Hidrólisis de la fécula: hidrolizado en medio
de agar de fécula-sales inorgánicas.

5) Leche descremada: peptonizada y coagulada.

25 6) Producción de pigmento melanoide: no se produ-
ce en agar de tirosina ni en agar de peptona-levadura-hierro.

7) Resistencia a la sal (de acuerdo con el méto-
do publicado en Inter. J. System. Bacteriol. 21, 240-247,
1971):

30

3089

1	Cloruro sódico concentrado, %	Crecimiento
	0	bueno
	1,5	moderado a bueno
	3,0 o más	ningún crecimiento

- 5 8) Descomposición de celulosa: no se descompone.
 9) Producción de nitrito (utilizando el medio orgánico descrito en Inter. J. System. Bacteriol., 21, 240-247, 1971 : no se produce.

10 Como se ha descrito anteriormente, la cepa A 11725 tiene esporas que crecen cada una de ellas individualmente, en la punta del esporóforo producido por el micelio substrato ramificado, no produce micelio aéreo intrínseco, y es un microorganismo mesofílico. Por lo tanto, es un microorganismo que pertenece al género Micromonospora.

15 Por las razones expuestas arriba, la cepa A 11725 se denomina Micromonospora cepa A 11725.

20 Las sustancias antibióticas A 11725 I a III pueden ser producidas cultivando la cepa anterior Micromonospora sp A 11725, en un medio que contiene los ingredientes convencionalmente utilizados para el cultivo de microorganismos en condiciones aerobias y, seguidamente, separando por extracción las sustancias antibióticas acumuladas en el producto cultivado.

25 Como medio de cultivo puede utilizarse bien sea un medio sólido, o un medio líquido. Para la producción en gran escala, se prefiere un medio líquido, especialmente, un medio acuoso. Haciendo referencia a los componentes del medio, pueden utilizarse, adecuadamente, como fuente de carbono: glucosa, fécula, glicerina, sacarosa, melazas, dextrina y similares. Como fuente de nitrógeno, son adecuadas:

1 -peptona, extracto de carne, polvos de soja y caseína hidro-
lizada. Pero, también pueden utilizarse: desperdicios de
semilla de algodón, licor de maceración de maíz, nitratos
y sales amónicas. Pueden utilizarse, también, otras substan-
5 cias inorgánicas que contienen cationes tales como sodio,
potasio, magnesio, calcio, cobalto, manganeso y hierro, y/o
aquéllas que contienen aniones tales como cloro, ácido sul-
fúrico, ácido fosfórico y ácido acético. Además, para fa-
vorecer el crecimiento de los microorganismos, se pueden
10 utilizar también levadura seca y extracto de levadura. Con
el fin de ajustar el pH del medio, puede añadirse a éste
carbonato cálcico. Además, con el fin de suprimir la forma-
ción de espuma durante el cultivo, se puede añadir una can-
tidad adecuada de agente desespumante, tal como resina de
15 silicona, aceite animal o vegetal, etc. El medio que es
particularmente adecuado para la práctica del método de
acuerdo con la presente invención, es un medio que contiene
glucosa, dextrina, polvos de soja desgrasados, carbonato
cálcico y cloruro de cobalto, como componentes del medio.

20 El cultivo puede realizarse en condiciones utili-
zadas convencionalmente para la producción de sustancias
antibióticas. La temperatura de cultivo puede oscilar en-
tre 20 y 37°C, preferiblemente, entre 26 y 30°C. Los días
de cultivo, que pueden variar dependiendo de las condicio-
25 nes de cultivo, son, en general, de 4 a 5 días.

Aunque en la presente invención puede utilizarse
cualquier método de cultivo convencionalmente conocido, es
adecuado, desde el punto de vista de una producción en gran
escala, efectuar el cultivo bajo aireación, con agitación,
30 en un tanque de fermentación. Como el método más adecuado

1 para la separación y recogida de las sustancias antibióti-
cas A 11725 I, II y III desde el producto de cultivo, se
separan primeramente por filtración o centrifugación las
células de los microorganismos y otras sustancias sólidas
5 y, seguidamente, se somete el filtrado a una extracción
por el método de extracción que utiliza un disolvente orgá-
nico. Como disolventes orgánicos a utilizar para la extrac-
ción, se pueden mencionar los hidrocarburos clorados tales
como cloroformo, dicloroetileno, tricloroetileno, etc., y
10 los ésteres de ácidos alifáticos, tales como acetato de
etilo, acetato de butilo, acetato de amilo, etc. Se pueden
utilizar, también, otros disolventes orgánicos que puedan
disolver bien las sustancias A 11725 I, II y III, y que
sean difícilmente miscibles con agua.

15 El extracto en disolvente orgánico que contiene
las sustancias A 11725 I, II y III, puede concentrarse por
evaporación bajo presión reducida, hasta 1/100-1/200 de su
volumen, el cual concentrado se ajusta, a su vez, a pH 1,0
- 3,0 con un ácido, tal como ácido clorhídrico, ácido sul-
20 fúrico o ácido acético, seguido por separación de la capa
acuosa, ajustándose seguidamente a pH 7,8 - 9,0 con una so-
lución alcalina, tal como sosa cáustica, potasa cáustica o
amoníaco, y sometiéndolo después nuevamente a extracción
con un disolvente orgánico. Mediante concentración de este
25 extracto por evaporación del disolvente bajo presión redu-
cida, hasta sequedad, se obtiene el producto crudo que con-
tiene las sustancias A 11725 I, II y III. El producto cru-
do se fracciona por un método tal como cromatografía en
columna, utilizando gel de sílice o distribución en contra-
30 corriente. Cada una de las fracciones se somete a cromato-

1 -grafía de capa delgada por gel de sílice, para detectar
el componente contenido en ella. Las fracciones que contie-
nen A 11725 I, II y III puros, respectivamente, se recogen
y se evaporan bajo presión reducida, hasta sequedad, para
5 dar polvos blancos de los respectivos compuestos que cons-
tituyen el objetivo.

La presente invención se explica con mayor deta-
lle con referencia al siguiente ejemplo, por el cual no
está limitada la presente invención.

10

Ejemplo 1

Preparación de las sustancias antibióticas
A 11725-I, A 11725-II y A 11725-III.

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad,
15 se dosificaron 100 ml de un medio (pH 7,0) que contiene 1%
de dextrina, 1% de glucosa, 0,5% de caseína hidrolizada,
0,5% de extracto de levadura y 0,1% de carbonato cálcico,
y se esterilizó el medio mediante calentamiento a 120°C,
durante 20 minutos. En cada una de las 10 ampollas que con-
20 tenían este medio, se inoculó la cantidad, que cabe en un
anillo de platino, de caldo de cultivo y cepa de Micromonos-
pora sp. A 11725 cultivada en agar inclinado, y se realizó
un cultivo bajo agitación por sacudidas, a 30°C, durante
120 horas. Estos cultivos sembrados se trasplantaron a un
25 recipiente fermentador, que contenía 20 litros del medio
esterilizado térmicamente, que tenía la misma composición,
y se realizó el cultivo a 30°C, bajo aireación aséptica de
20 litros por minuto, con agitación a 300 revoluciones por
minuto, durante 72 horas. Subsiguientemente, se trasplanta-
ron 10 litros de caldo de cultivo anterior, a un depósito

30

3089

1 de 250 litros de capacidad, que contenía 200 litros de me-
dio esterilizado térmicamente (pH 7,2), que contenía 5% de
dextrina, 0,5% de glucosa, 3% de polvos de soja desgrasa-
dos y 0,2% de carbonato cálcico, y se realizó el cultivo a
5 30°C, bajo aireación aséptica de 100 litros por minuto,
con agitación a 250 revoluciones por minuto, durante 120
horas, para obtener 190 litros de producto de cultivo.

El producto de cultivo anterior (190 litros) se
filtró para separar las células de los microorganismos y
10 otros sólidos, obteniéndose de este modo 160 litros de fil-
trado. Este filtrado se sometió a extracción con la misma
cantidad de acetato de etilo, obteniéndose de este modo 160
litros de solución en acetato de etilo, que contenía los
compuestos que constituían el objetivo. Dicha solución se
15 concentró bajo presión reducida, hasta 50 litros, los cua-
les se reunieron, a su vez, con 20 litros de una solución
acuosa de ácido clorhídrico, de pH 2,5, para ser transferi-
da a la capa acuosa mediante transferencia de fase. Además,
la solución acuosa de ácido clorhídrico se ajustó a pH 8,5
20 con amoníaco concentrado, y se sometió a extracción con 20
litros de cloroformo. La capa clorofórmica se concentró
hasta sequedad, para dar 8,5 g de producto crudo.

El producto crudo anterior (8,5 g) se disolvió
en 50 ml de cloroformo, y la solución resultante se adsor-
25 bió por una columna de gel de sílice (3 cm x 55 cm) rellena
previamente con cloroformo. Seguidamente, se reveló con un
disolvente que comprendía cloroformo-metanol-28% de amoníaco
(20:1:0,1) en fracciones de 15 ml cada una de ellas. El
compuesto que constituía el objetivo, contenido en cada una
30 de las fracciones, se sometió a ensayo para detectar la ac-

1 actividad antibacteriana, utilizando Bacillus subtilis y cro-
matografía de capa delgada, empleando, como disolvente re-
velador, cloroformo-metanol-7% de amoníaco (40:12:20:capa
inferior), y se recogieron las fracciones que contenían
5 dicho compuesto.

Se encontró que las fracciones desde el número
61 hasta el número 78 contenían solamente la substancia
identificada como A 11725 I, y se concentraron hasta seque-
dad estas fracciones, para obtener 1,2 g de A 11725 I. Se
10 encontró que las fracciones desde el número 126 hasta el
número 160 contenían solamente la substancia identificada
como A 11725 II, y se concentraron hasta sequedad estas
fracciones, para obtener 1,7 g de A 11725 II. Se encontró
que las fracciones desde la número 241 hasta la número 320
15 contenían solamente la substancia identificada como A 11725
III, y se concentraron estas fracciones hasta sequedad, pa-
ra obtener 0,2 g de A 11725 III.

20

25

30

3089

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 procedimiento para producir sustancias antibióticas o sus derivados, que comprende cultivar un microorganismo capaz de producir, por lo menos, una de las sustancias antibióticas A 11725 I, II y III, en un medio que contiene fuente de carbono asimilable, fuente de nitrógeno y sustancia inorgánica, en condiciones aerobias, para acumular dichas sustancias en dicho medio y, seguidamente, recoger las sustancias así acumuladas, mediante separación desde el producto cultivado.

15

20

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual el microorganismo es Micromonospora sp. A 11725.


25

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2ª, en el cual se producen todas las sustancias A 11725 I, II y III, y las sustancias recogidas se separan por fraccionamiento en los respectivos compuestos.

30

3089

4ª.- Un procedimiento para la obtención de sustancias antibióticas o sus derivados.

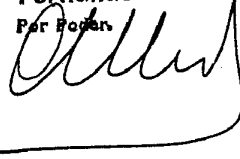


1 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 17. AGO. 1979
P.A.

Fernando de Elizburu
Por Poder.

10 

10

15

20

25

D N M 30

3089



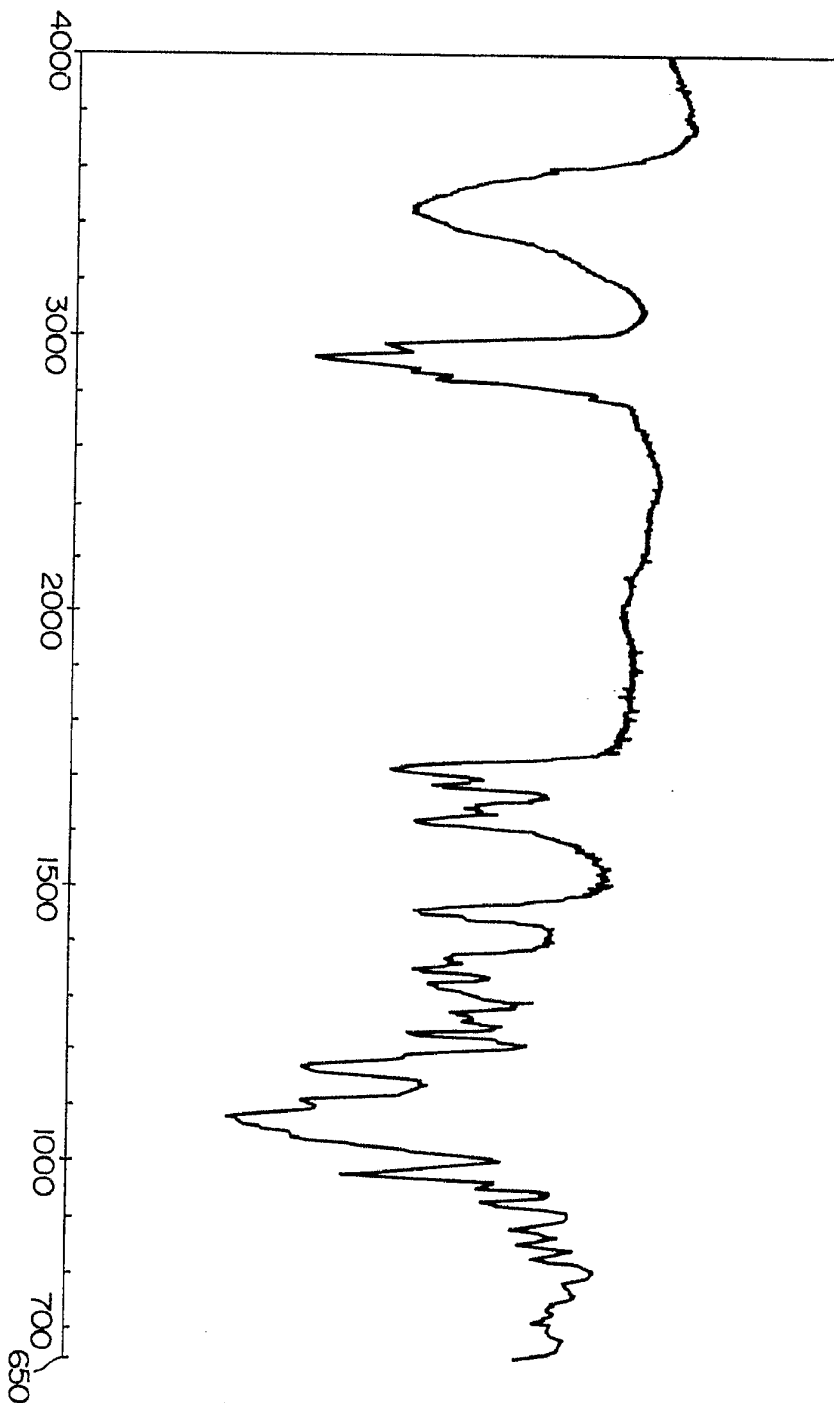


FIG. 1

P71872

Fernando J. ...
Por Poda

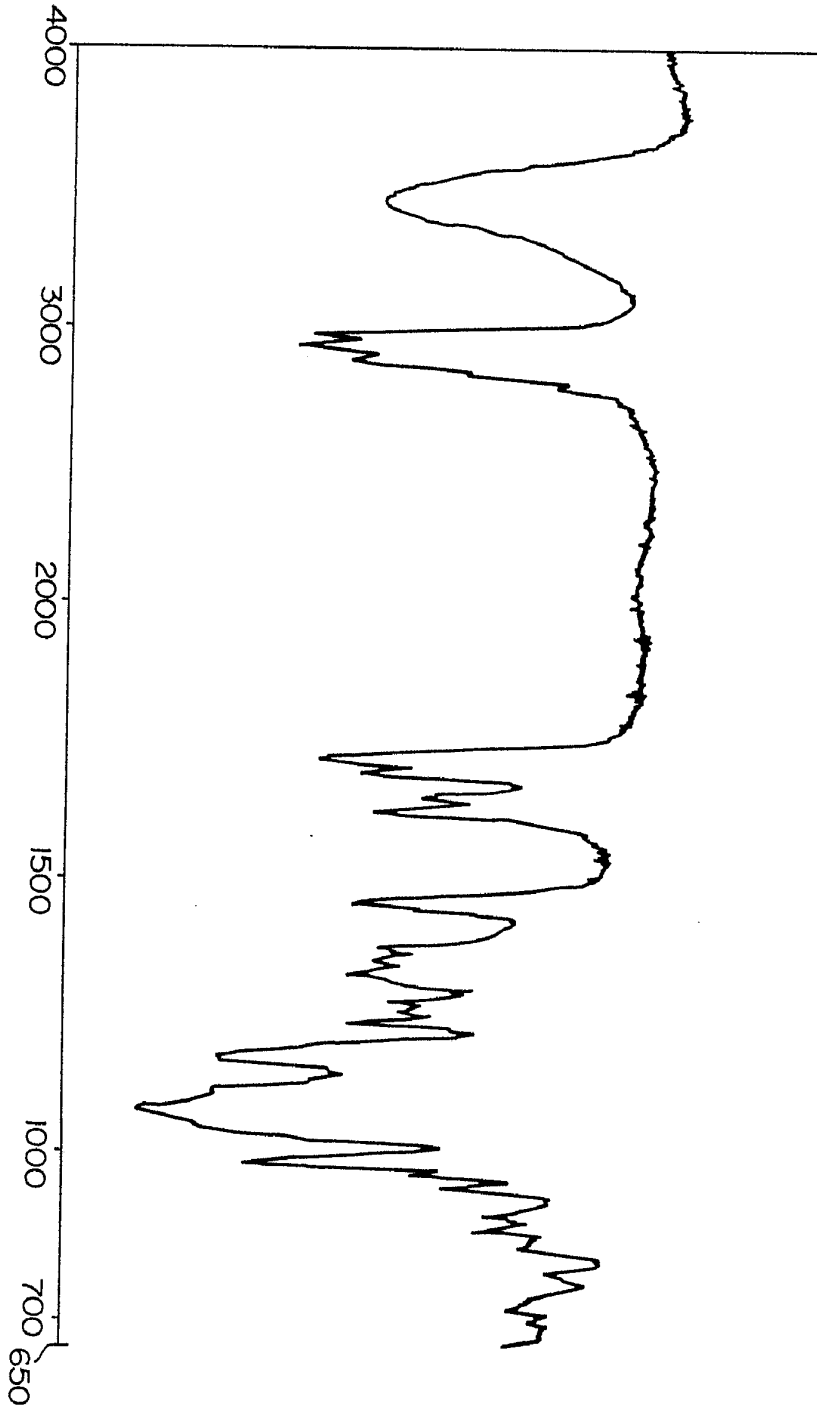


FIG. 2

P71872

Fernando de Izaburu
Por Poder.

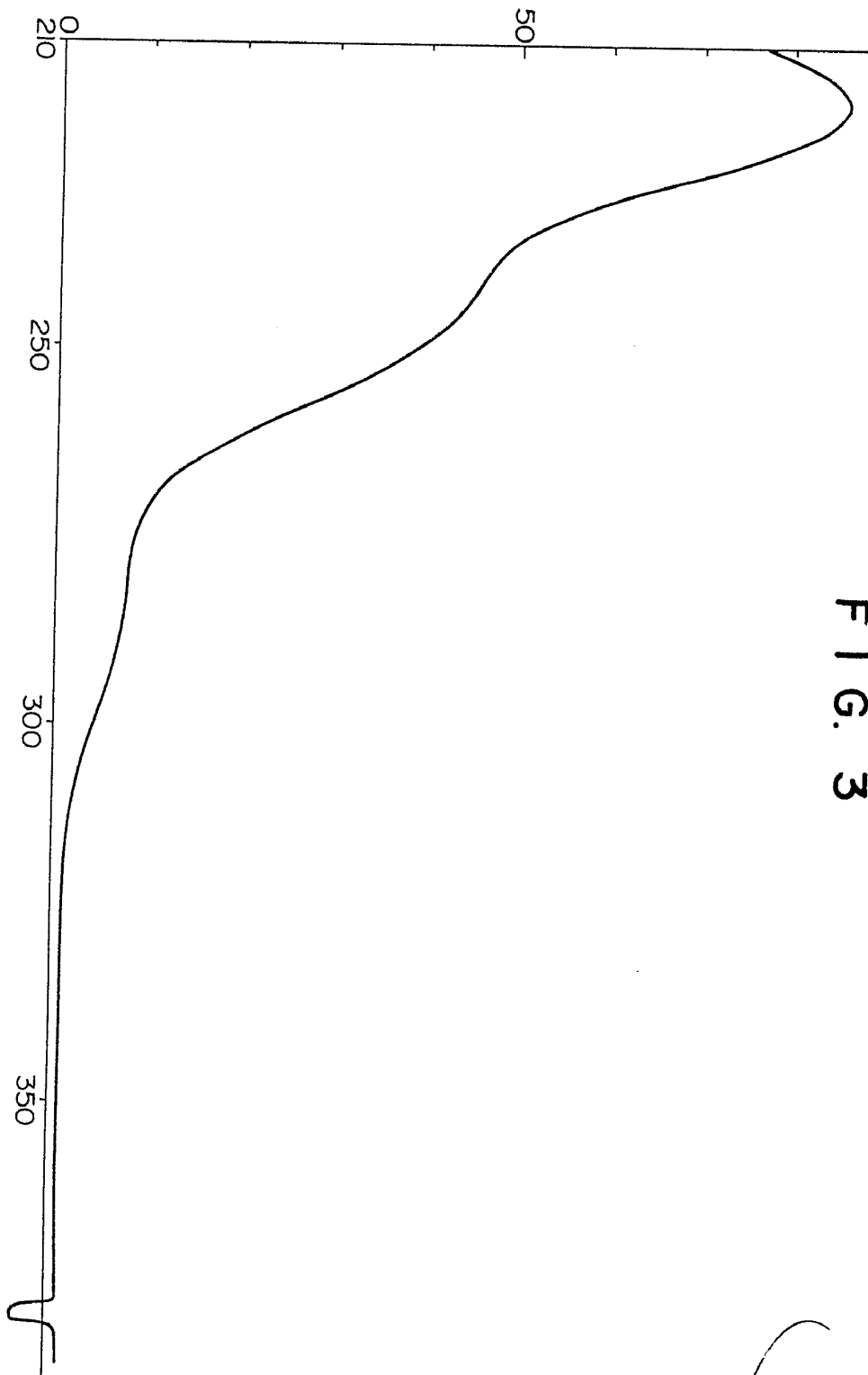


FIG. 3

Fernando de Lizaburu
Per Poder.

P71872

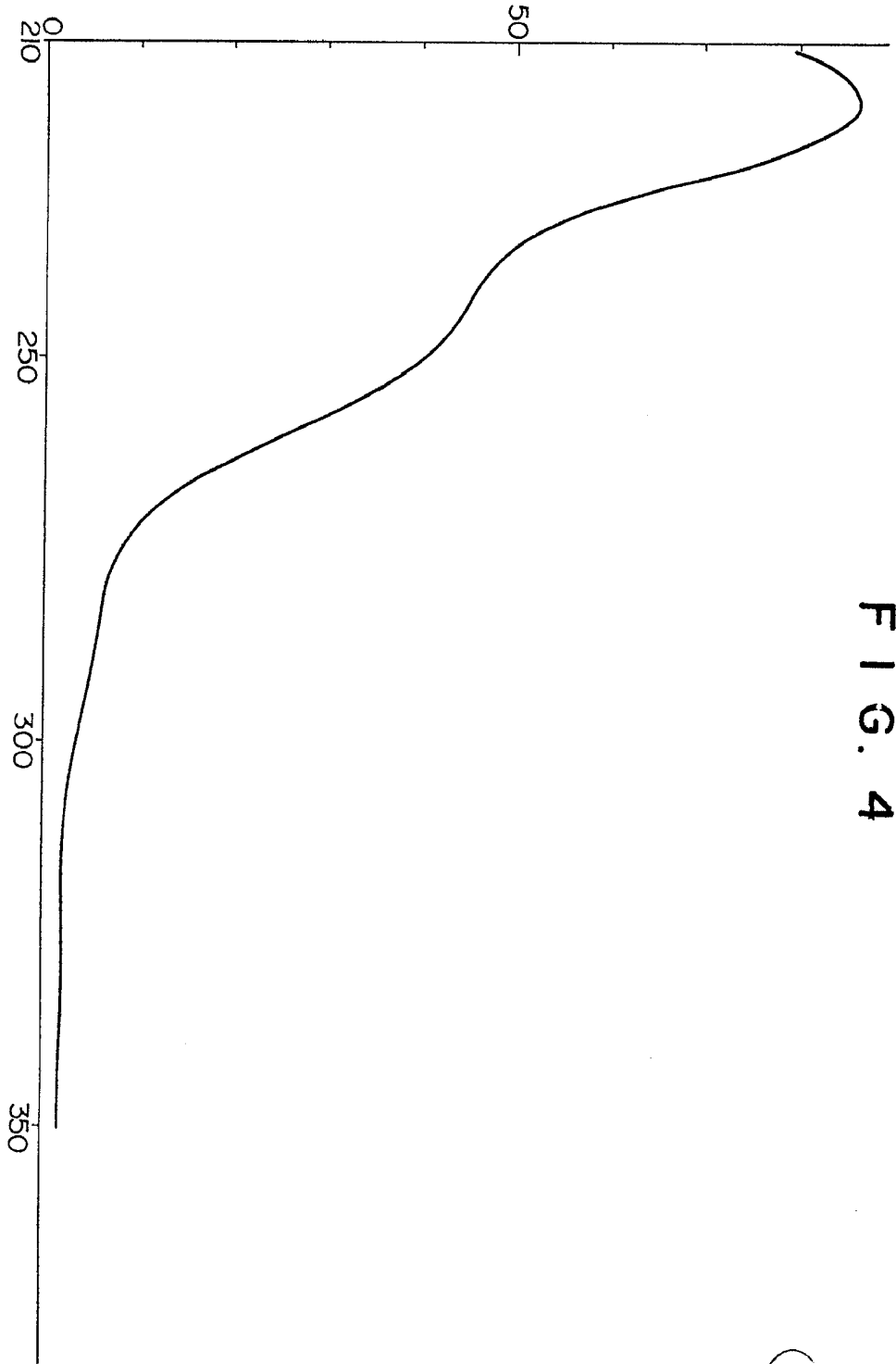


FIG. 4

Fernando de Lizaburu
Por Poder
[Signature]

P71872

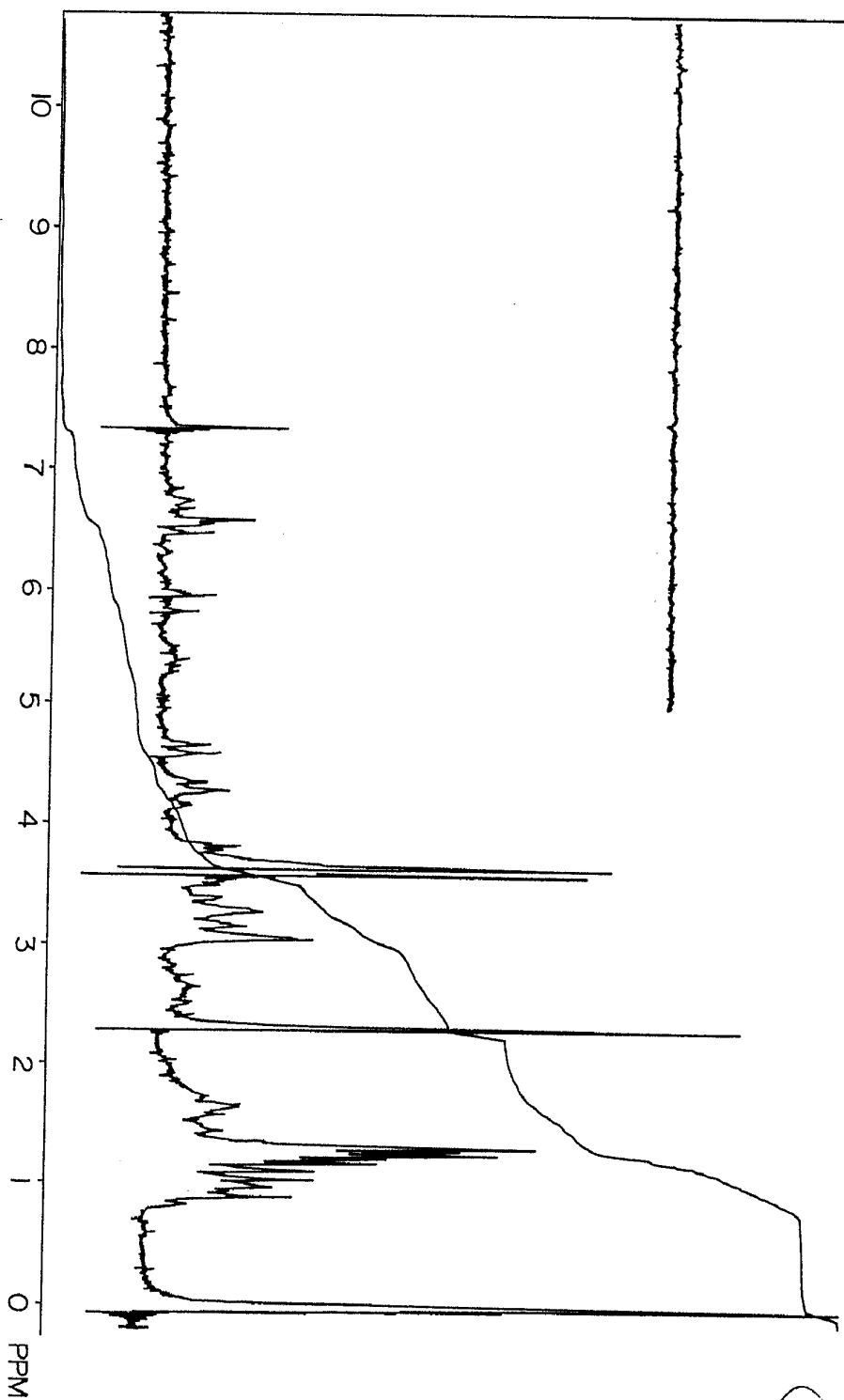


FIG. 5

Fernando de Elizaburu
Por Poder.

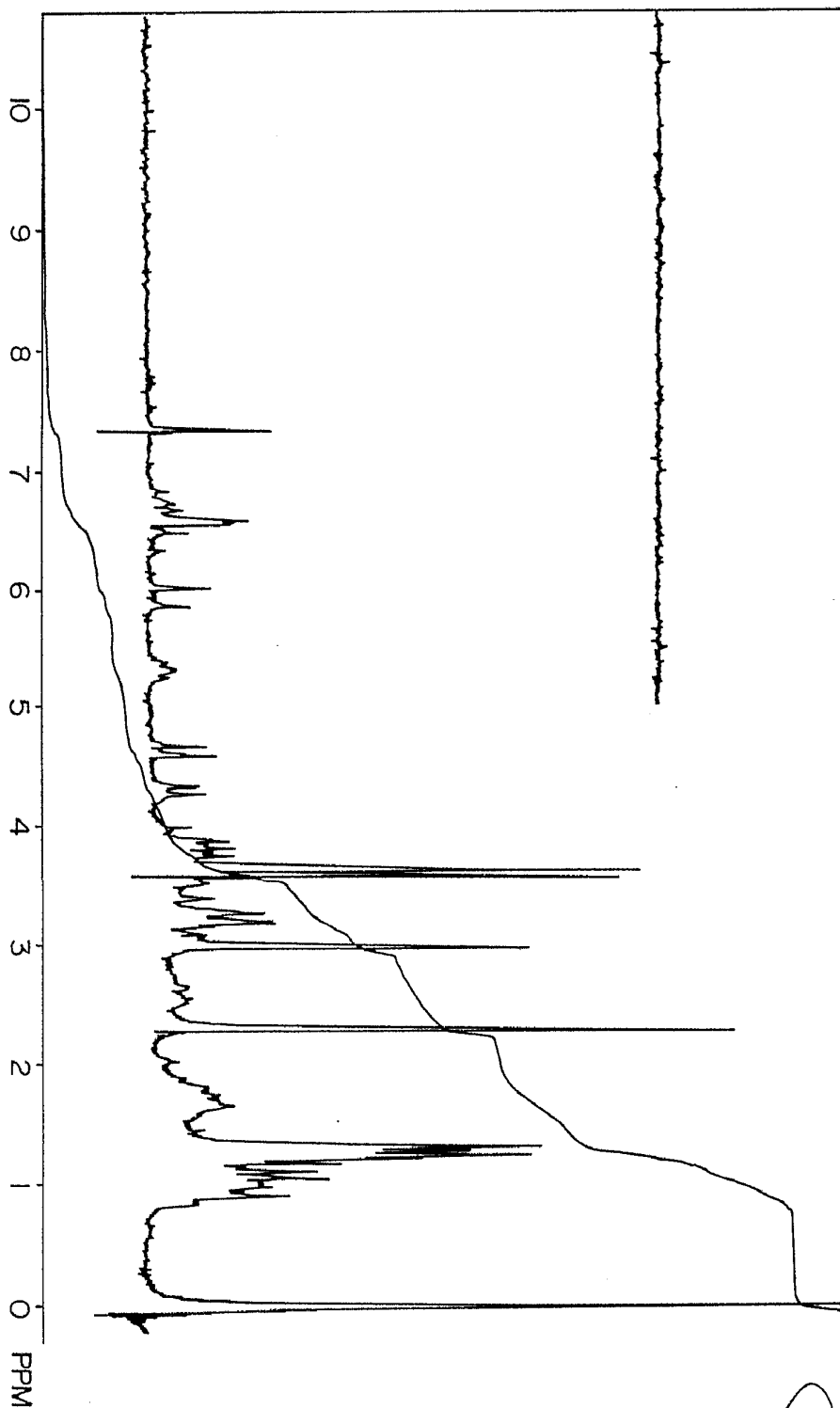


FIG. 6

Fernando de Izaburu
Por Poder

P71872

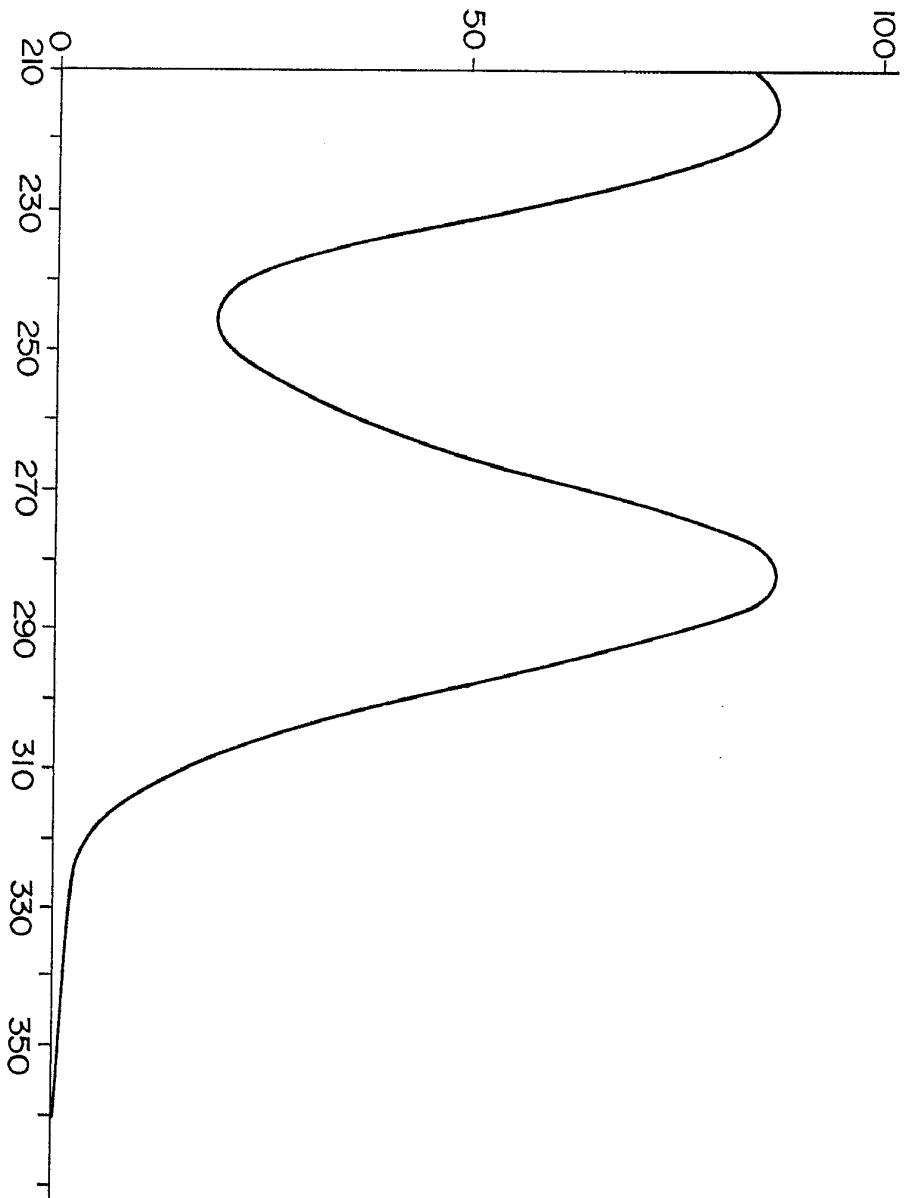


FIG. 7

P71872

Fernando de la Cruz
Por Poder.

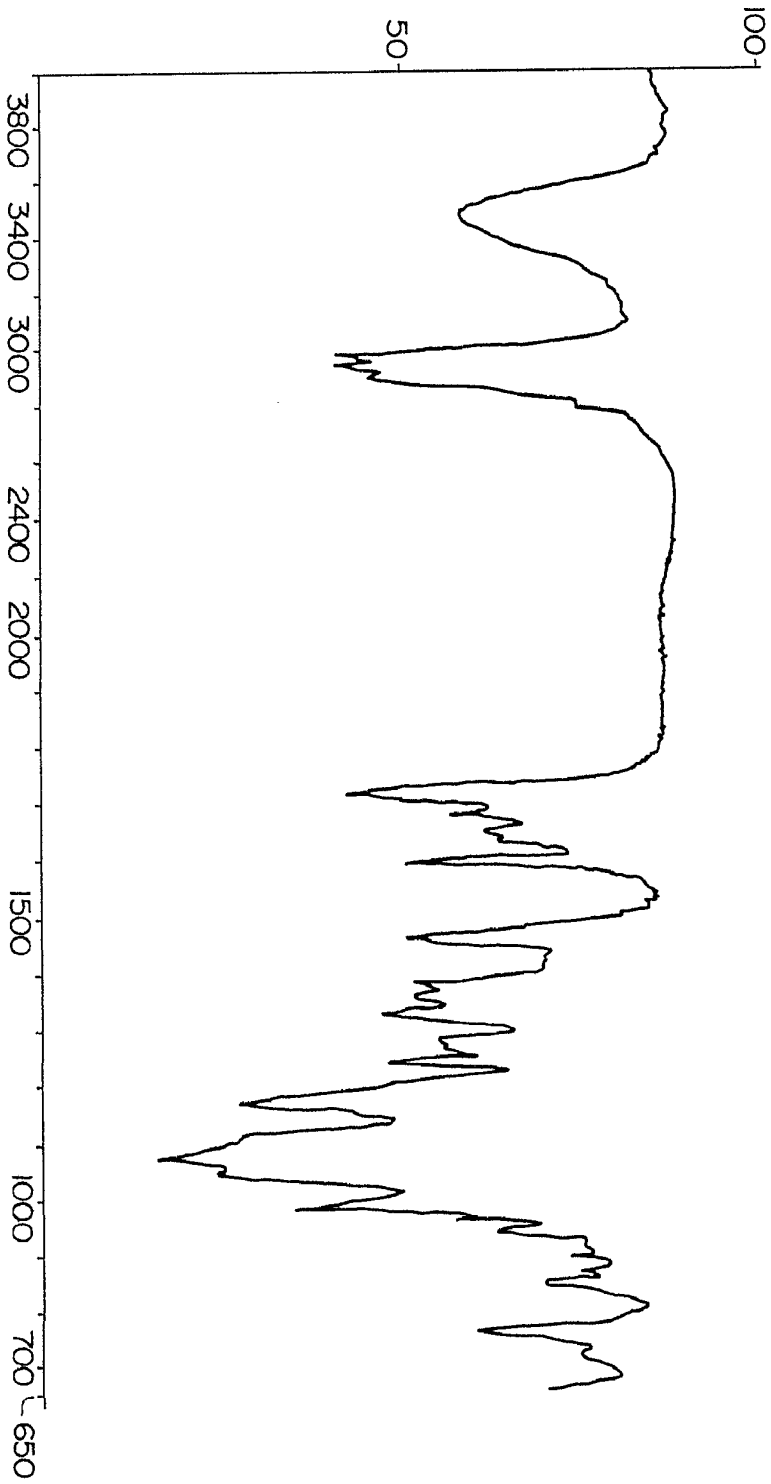


FIG. 8

P71872

Fernando de Izaburu
Por Poder. *5/11/72*

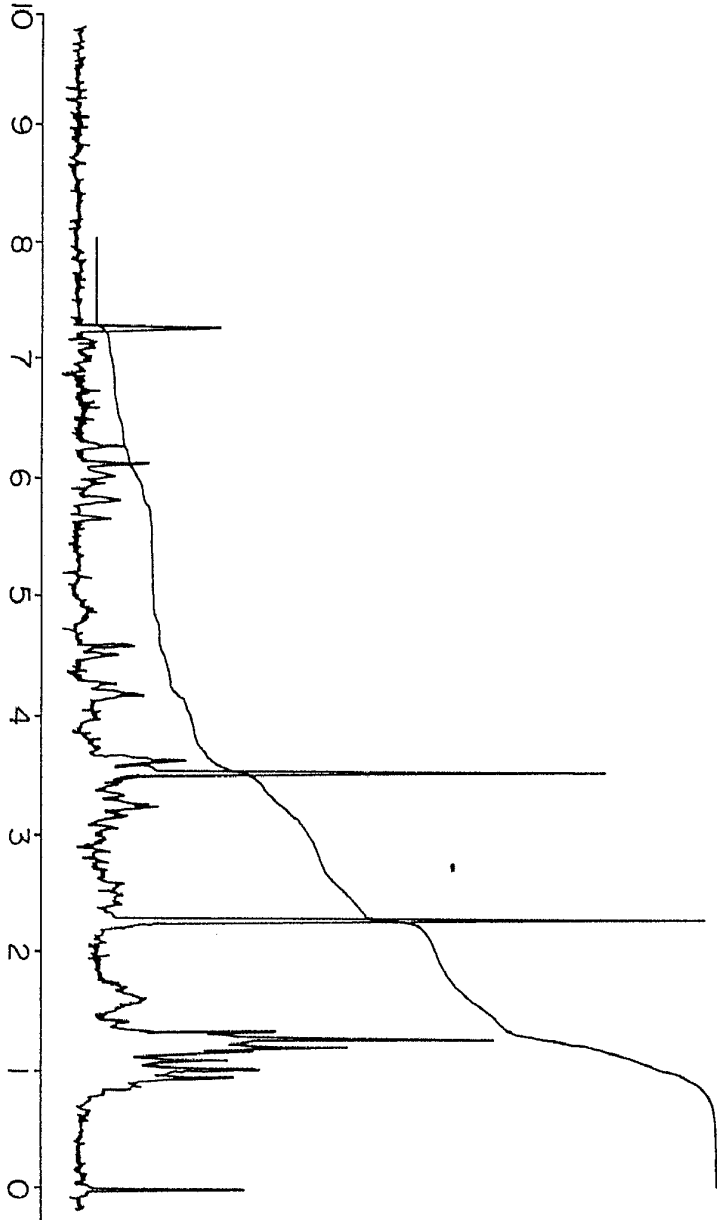
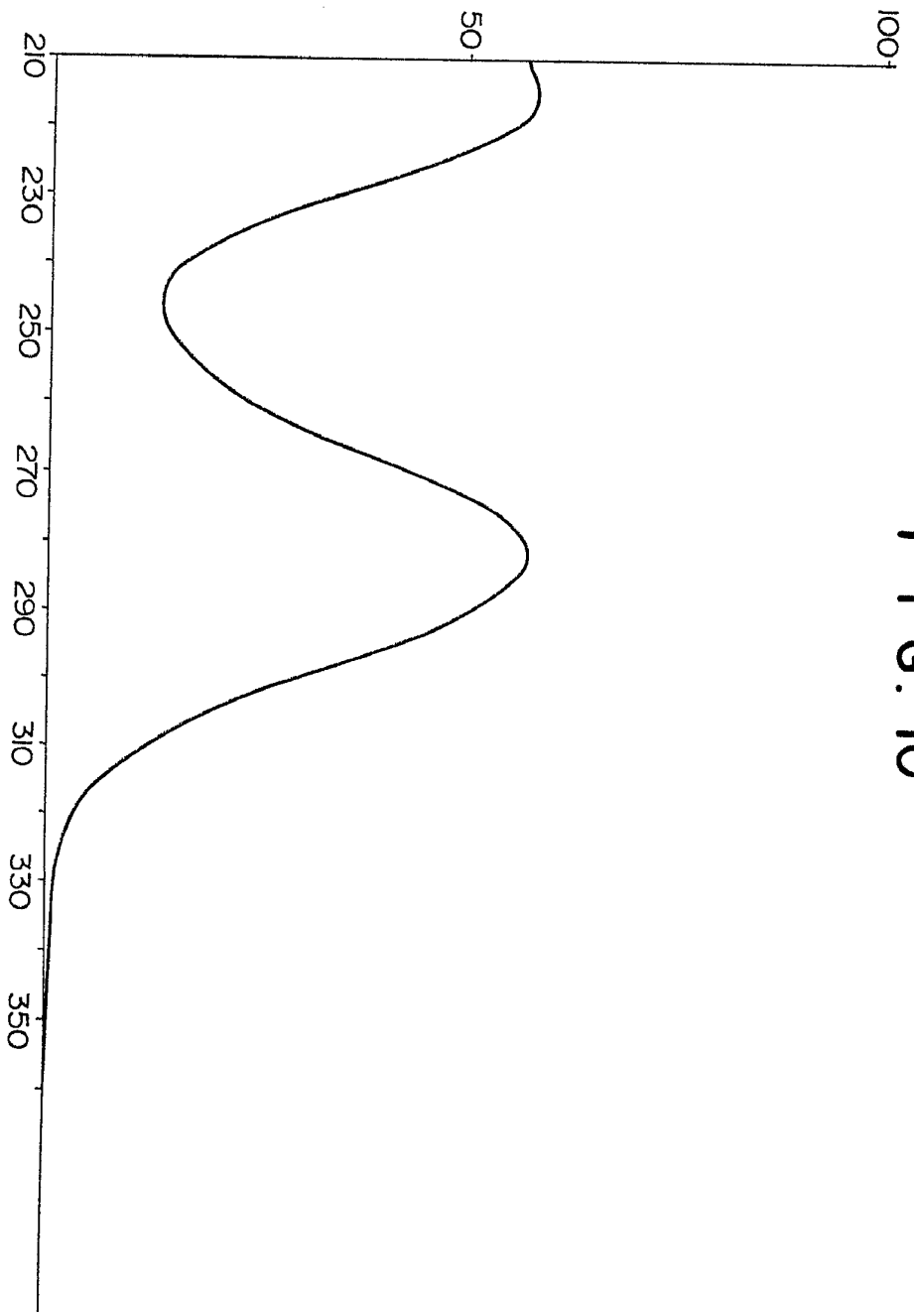


FIG. 9

P71872

Fernando de Elizaburu
For Podex



F I G . 10

P71872

Fernando de Izaburu
Por Poder.

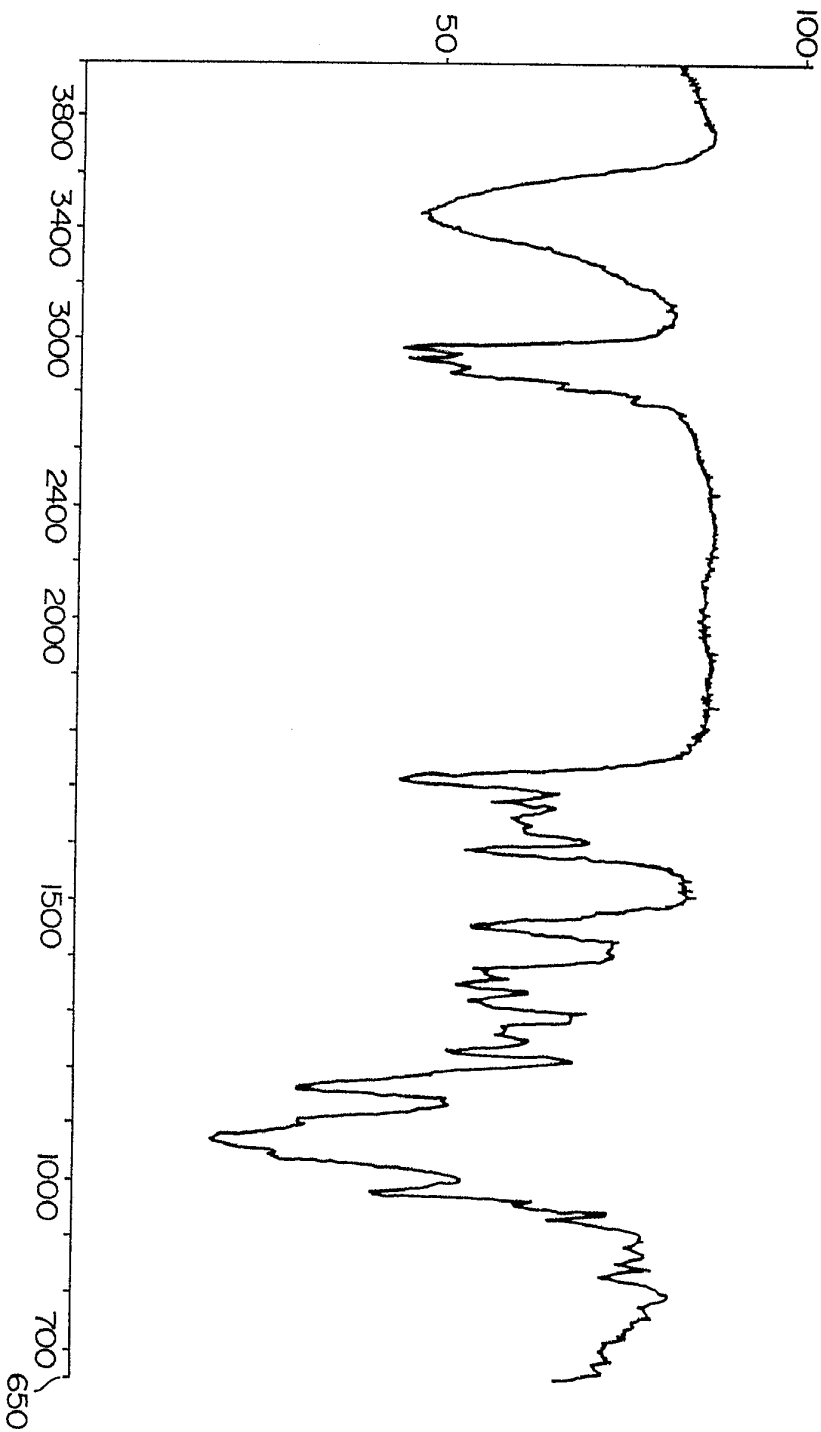


FIG. 11

Fernando de Izaburu
Por Poder.

P71872

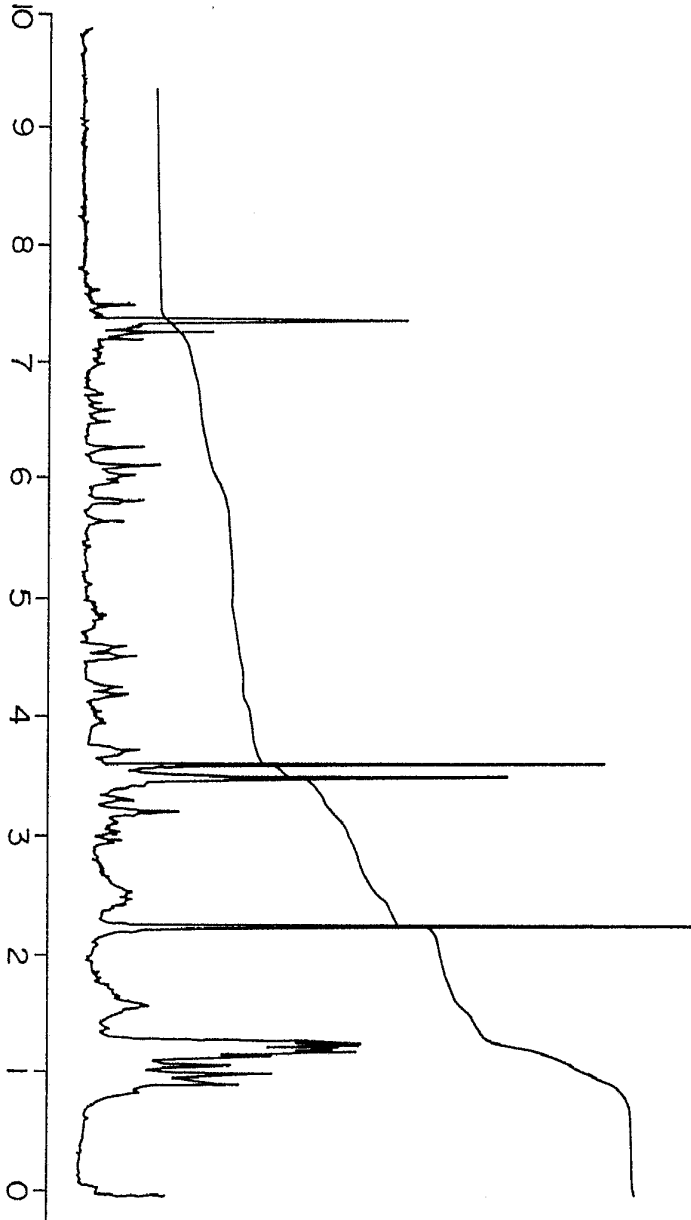


FIG. 12

Fernando de Elizaburu
Por Poder.

P71872

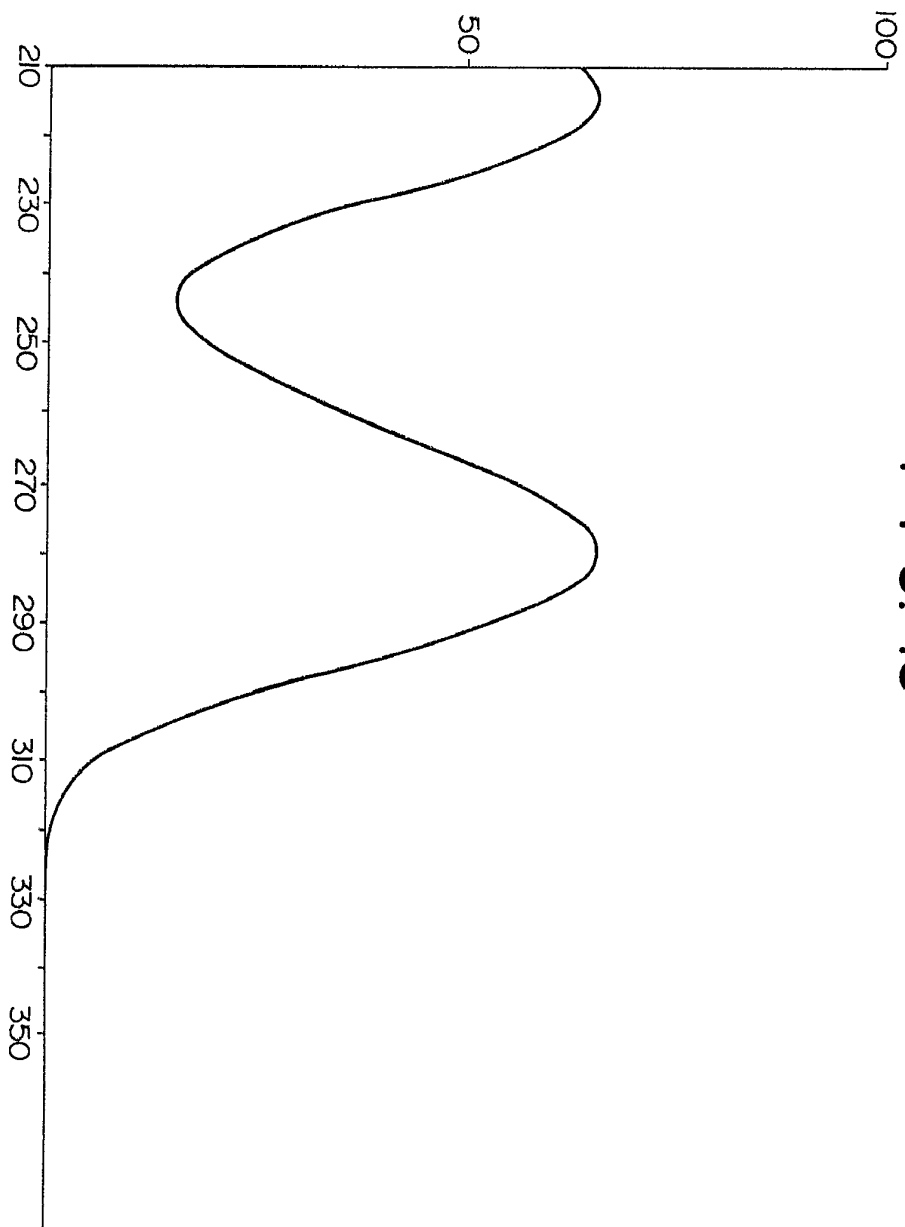


FIG. 13

Fernando de Elizaburu
Fernando de Elizaburu
For Poder.

AR/ALC. TIME CORRECTED, 100% TGA/VA

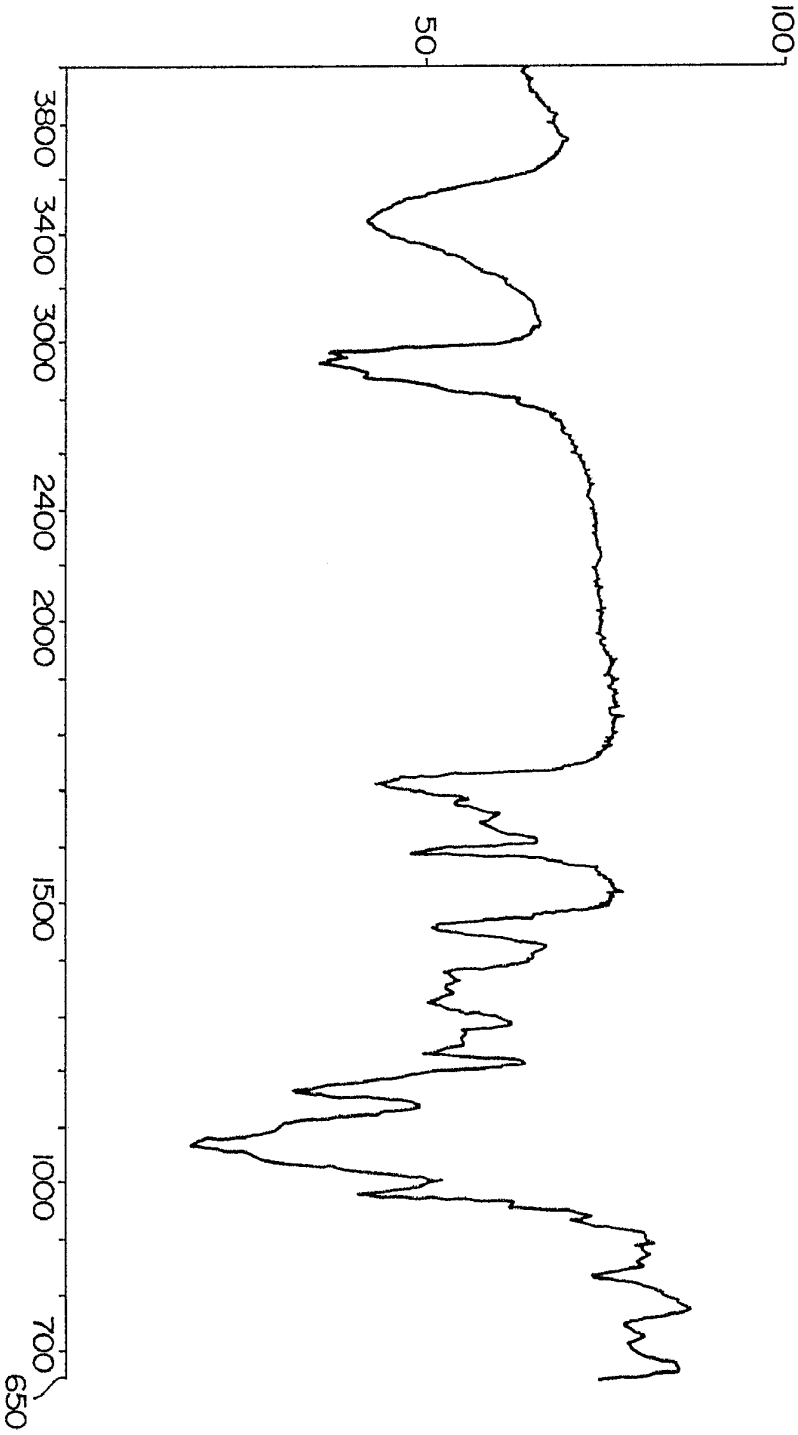


FIG. 14

Fernando de Elizaburu
Por Poder.

P71822

EXCITACION DE UN SISTEMA DE UNIDADES

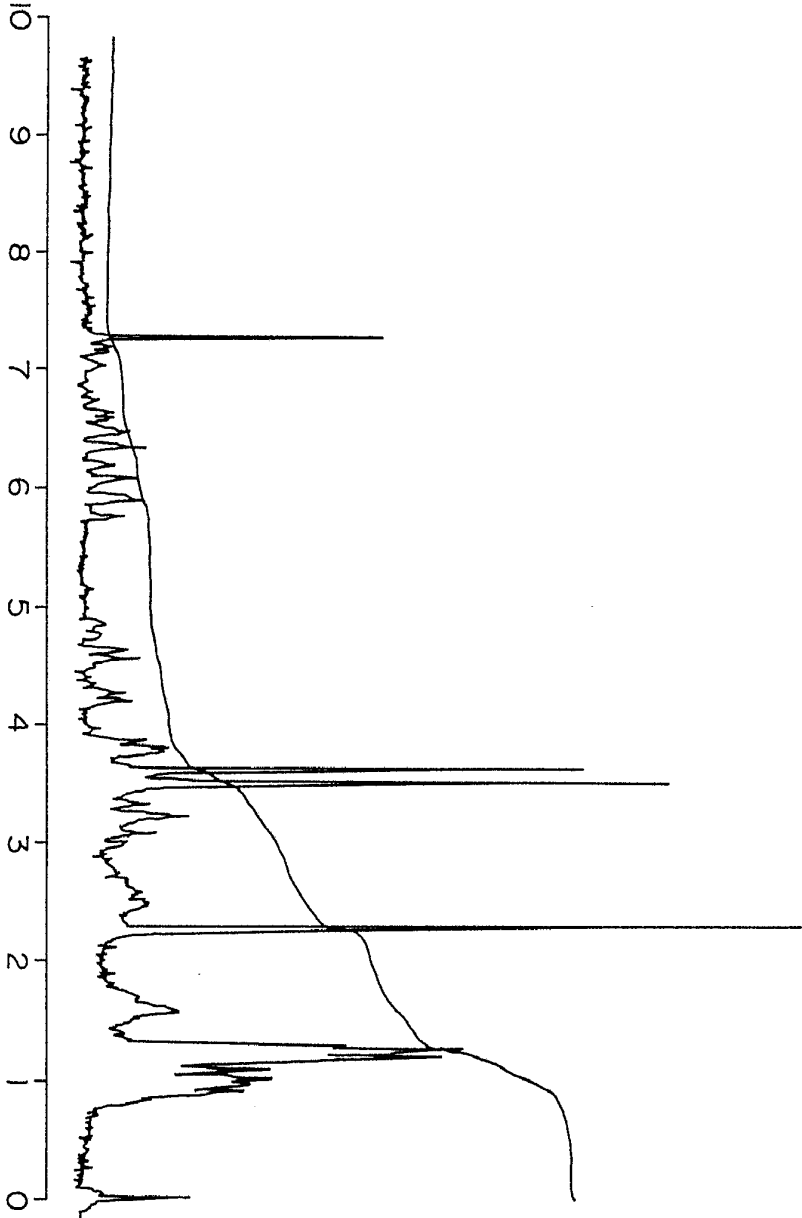


FIG. 15

Fernando de Izaburu
Por Pedr.

P71872