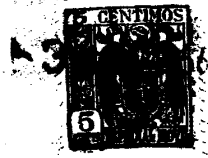


226255

3 MAY 1956 P.- 14.061.-

A 14864  
Case P.C. 1052  
Rehecha I.



226255

MEMORIA DESCRIPTIVA  
para solicitar  
P A T E N T E D E I N T R O D U C C I O N  
e n  
E S P A Ñ A  
por DIEZ años

a nombre de CHAS. PFIZER & CO. INC., entidad norteamericana, establecida en 11 Bartlett Street, Brooklyn, Nueva York, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UN NUEVO ANTI-BIOTICO".

Este invento se refiere a un nuevo y útil antibiótico denominado P.A. 105 y, más especialmente, a su producción por fermentación, a los métodos para su extracción y concentración de sus soluciones brutas, tales como caldos de fermentación, a los procedimientos para su purificación y a los métodos para la preparación de sus sales. El invento incluye dentro de su alcance, el antibiótico en formas diluídas, como concentrados brutos y en forma cristali-



zadas puras. Estos nuevos productos son especialmente útiles para combatir microorganismos patógenos, especialmente los microorganismos Gram-positivos.

5 El nuevo antibiótico se forma durante el cultivo, en condiciones controladas, de una nueva cepa de una especie de microorganismo conocido con el nombre de Streptomyces antibioticus, que fué identificado por siembra y comprobación de un cultivo del mismo en los medios de cultivo empleados usualmente para la identificación de tales micro-  
10 organismos. El cultivo del microorganismo ha sido depositado en American Type Culture Collection, Washington, D.C. y añadido a su colección de microorganismos como ATCC 11891. La identificación de esta nueva cepa, designada Isolate N° 15784-1 en la colección de cultivos de Chas. Pfizer & Co. Inc. de Brooklyn, N.Y., ha sido hecha con ayuda del "Manual of De-  
15 terminative Bacteriology", en Bergey, sexta edición, (1948).

Las características de cultivo de la nueva cepa S. Antibioticus figuran en el siguiente cuadro. Salvo indicación en contrario, los resultados están basados en seis  
20 muestras iguales, incubadas durante dos semanas. Los colores que figuran acompañados de una R, son los de "Color Standards and Nomenclature", de Ridway.

226255



## CUADRO I

Streptomyces antibioticus

ATCC 11891

## Color

Medio	Importancia del desarrollo	Micelio aéreo y esporulación	Pigmento soluble	Observaciones
Glucosa Agar Esparraguina.	Moderada	Micelio aéreo blanco; esporulación escasa.	Pardo medio a pardo oscuro.	Reverso pardo; dioforos esporas 0,65 x 1,0 u
Gelatina	Moderada	Micelio gris, céreo; sin esporulación	Pardo oscuro.	Buena Licuación
Leche descremada (28°C)	Moderada	Anillo blanco crema.	Pardo oscuro.	No hay coagulación; hidrólisis. Sin variación en el pH.
Agar glicosado	Moderada	Desarrollo transparente, céreo, pardo claro; sin esporulación.	Pardo claro.	Reverso pardo claro.
Malato cálcico.	Escasa a moderada.	Micelio blanco aéreo; escasa esporulación blanco grisacea.	Ninguno.	Reverso blanco cremoso; el malato cálcico es digerido.
Agar sintético	Escasa	Esporulación gris ratón (R)	Ninguno	Reverso blanco gris claro.
Agar nutricio	Escasa	Desarrollo transparente, céreo pardo claro.	Pardo medio.	Reverso pardo claro.
Agar de Emerson	Escasa a moderada	Micelio arrugado, céreo, gris claro a amarillo; sin esporulación.	Pardo oscuro.	Reverso pardo claro.
Celulosa	Escasa	Micelio blanco aéreo.	Pardo claro.	
Caldo de dextrosa con nitrato	Escasa		Ninguno	Los nitratos no son reducidos.
Discos de patata.	Moderada	Esporulación próxima a gris a aurora (R)	Pardo oscuro a negro	
Placas de almidón.	Escasa	Desarrollo céreo, amarillo a pardo; esporulación próxima a gris Hathi (R).	Ninguno	Reservo amarillo oscuro a gris; no hay hidrólisis.



En el cuadro II se describen algunas de las diferencias significativas entre la nueva cepa N<sup>o</sup>. 15784-1 y la descripción del S. Antibioticus que figura en el Manual de Bergey.

5

CUADRO II

<u>MEDIO</u>	<u>CEPA ATCC 11891</u>	<u>Descripción de Bergey</u>
10 Gelatina	Micelio gris, céreo; sin evaporar	Desarrollo pardo oscuro en la superficie con manchas de micelio aéreo gris.
15 Leche con tornasol	(En la leche descremada tornasol). Anillo blanco crema a pardo oscuro; coagulación e hidrólisis.	Anillo espeso, parduzco, en la superficie de la leche. Micelio aéreo gris ratón con tinte verdoso el cultivo se pone pardo. No se coagula la leche; no se aclara.
20 Todos los medios de cultivo que contengan sustancias orgánicas.	Pigmento soluble pardo claro a pardo oscuro.	Pigmento soluble pardo intenso.

25 La capa de S. antibioticus descrita en el Manual de Bergey produce el antibiótico actinomicina, que, por los datos que se consignan más adelante, queda claramente establecido que es diferente de antibióticos P. A. 105.

30 Debe entenderse que para la producción del P.A. 105, el presente invento no se limita a este organismo particular o a organismos que responden plenamente a la anterior descripción, que sólo se dá con fines ilustrativos. De hecho se desea y pretende especialmente, incluir el empleo de las



mutaciones derivadas del organismo descrito, empleando varios medios, tales como la acción de los rayos X, rayos ultravioletas, mostazas nitrogenadas, etc.

5 El antibiótico P.A. 105, presenta una elevada actividad frente a gran variedad de microorganismos. Como se ha dicho anteriormente, es especialmente digna de mención su acción sobre los organismos Gram-positivos. Aunque desarrolla alguna actividad sobre los organismos Gram-negativos, esta actividad es, en general, de un nivel algo inferior. El

10 cuadro siguiente ilustra el espectro antibiótico del P.A. 105 frente a una gran variedad de organismos Gram-negativos y Gram-positivos. Estas pruebas fueron llevadas a cabo sembrando caldo nutritivo que contenía diversas concentraciones del antibiótico puro, con el organismo particular especificado. La "concentración inhibitoria mínima" indicada en el

15 Cuadro III, en la concentración mínima del antibiótico (expresada en microgramos mililitro) con la cual deja de tener lugar el desarrollo del microorganismo. Dado que la mayor concentración empleada en estos ensayos fué la de 100 mcg/ml.,

20 no se indica con precisión la "concentración inhibitoria mínima" cuando tal concentración excedía, aparentemente, de los 100 mcg./ml., Los ensayos fueron realizados en condiciones normalizadas.



CUADRO III

Espectro del P.A. 105

	<u>Organismos</u>	Concentración inhibi- toria mínima del P.A. 105:mcg./ml.
5	<u>Organismos Gram-negativos</u>	
	<i>Brucella bronchiseptica</i>	25
	<i>A. aerogenes</i> 2	>100
	<i>E. coli</i> 21	>100
10	<i>Proteus Sp. 1</i>	>100
	<i>Ps. aeruginosa</i> 173	>100
	<i>Salmonella Typhosa</i> 344	>100
	<i>K. pneumoniae</i> 132	>100
	<i>S. paratyphie</i> A134	>100
15	B139	>100
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3.12
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6.25
	catarrhalis	3.12
	meningitidis	6.25
20		
	<u>Organismos Gram-positivos</u>	
	<i>Strep. faecalis</i> 121	1.56
	<i>Micrococcus pyogenes</i> var. aureus 5	0.19
	209	< 0.19
	<i>M. pyogenes</i> var. albus 3	0.78
25	<i>B. subtilis</i> 219	0.39
	<i>Diplococcus pneumoniae</i> , Tipo I	6.25
	Tipo I, A.T.C.O.	< 0.19
	Tipo III	3.12
	Tipo V	3.12
30	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , 15 A	0.3
	B-1	0.7
	G-2	0.7
	C-3	0.5
	<i>Corynebacterium xerose</i>	6.25
35	<i>Clostridium perfringens</i>	1.5
	aporegenes	1.5
	tetani	1.5
	<i>Bacillus anthracis</i>	0.7
	<u>Hongos</u>	
40	<i>Candida albicans</i> 8	100

El cuadro IV ofrece los resultados de pruebas si-

226255



milares llevadas a cabo en otro laboratorio, sobre diferen-  
tes organismos o cepas que los indicados en el cuadro III y  
además, representa el espectro del P.A. 105. En estas prue-  
bas, la concentración máxima del antibiótico fué de 900 mcg/ml.

5

CUADRO IVEspectro del P.A. 105. Microorganismo adicional

	Organismo	Concentración inhibi- toria mínima del P.A. 105:mcg./ml.
	<u>Organismos Gram-negativos</u>	
10	<i>E. coli</i>	225
	<i>E. coli</i>	450
	<i>E. typhosa</i>	225
	<i>Salmonella s.p.</i>	450
	<i>Aerobacter aerogenes</i>	225
15	<i>S. paratyphosa</i>	> 900
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	225
	<i>Brucella bronchisepticus</i>	?
	<i>B. pyocyaneus</i>	> 900
	NA II SM Resist.	112
20	NA IV <i>S. Fyphosa</i>	112
	<i>S. typhi-murium</i>	225
	<i>S. typhi-murium</i>	225
	<i>S. newport</i>	450
	<i>S. enteriditis</i>	225
25	<i>S. cholera suis</i>	225
	<i>Proteus vulgaris</i>	900
	<u>Organismos Gram-positivos</u>	
	<i>Strep. homo</i>	< 1,7
	<i>D. pneumoniae</i>	< 1,7
30	<i>Staph. h.</i>	< 1,7
	<i>B. subtilis</i>	< 1,7
	<i>Enterococcus</i>	< 1,7
	<i>Cl. walchii</i>	< ?
	<i>Staph. aureus 235</i>	< 1,7
35	<u>Hongos</u>	
	<i>Monilia albicans</i>	900



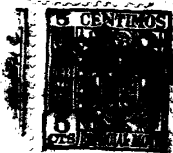
También se ha visto que el nuevo antibiótico es altamente eficaz contra organismos resistentes a los antibióticos corrientes que se encuentran en el comercio. Por ejemplo, ciertas cepas resistentes del Micrococcus pyogenes var. aureus, aisladas de casos clínicos, fueron sometidas al antibiótico P.A. 105, como se indica más arriba, para determinar la concentración inhibitoria mínima. A fines de control, se estudió también la concentración inhibitoria mínima de diversos antibióticos bien conocidos y los resultados de estas pruebas figuran en el cuadro V.

CUADRO V

Antibiótico:

Concentración inhibitoria mínima en mcg/ml.

<u>M. Pyogenes</u> <u>var. aureus</u> <u>Cepa</u>	<u>P.A.</u> <u>105.</u>	<u>Oxitetra-</u> <u>ciclina.</u>	<u>Cloro-</u> <u>tetra-</u> <u>ciclina.</u>	<u>Clor-</u> <u>amfe-</u> <u>nicol.</u>	<u>Baci-</u> <u>tracina</u>	<u>Neo-</u> <u>micina</u>	<u>Peni-</u> <u>clina</u>	<u>Polimi-</u> <u>cina.</u>
1	0,78	>100	100	6,25	56	3,12	60	>250
2	3,12	>100	56	6,25	28	3,12	15	>250
3	1,56	>100	50	6,25	28	1,56	7,5	>250
4	1,56	>100	100	12,5	14	25,00	60	>250
5	1,56	>100	50	6,25	14	1,56	15,0	>250
6	3,12	>100	50	12,55	28	50,0	7,50	>250
7	0,78	>100	100PI	6,25	28	0,78	60,0	>250
8	1,56	>100	100	6,25	14	1,56	3,75	>250
9	0,78	>100	50PI	3,12	56	1,56	>60	>250
10	0,78	>100	>100	6,25	14	3,12	60	>250
11	0,78	0,78	0,39	3,12PI	28	0,0	3,75	>250
12	0,78	>100	>100	6,25	14	0,78	>60	>250
13	0,78	>100	50	6,25	28	3,12	0,47	>250
14	0,78	>100	>100	6,25	14	0,78	60	>250
15	1,56	>100	100PI	3,12	7	0,78	0,93	>250
16	1,56	>100	50	6,25	56	0,78	15,0	>250
17	0,78	>100	100	3,12	28	3,12	60	>250
18	0,78	>100"	100	3,12PI	14	3,12	60	>250



PI indica inhibición parcial

"Vendida bajo la marca registrada "Terramicina"

Estas pruebas, además de demostrar la eficacia del antibiótico frente a estas cepas resistentes, indican también que el antibiótico P.A. 105 es distinto de la oxitetraciclina, clorotetraciclina, cloramfenicol, bacitracina, neomicina, penicilina y polimixina.

También se ha demostrado que el antibiótico P.A. 105 es eficaz contra diversas microbacterias, como se indica en el cuadro VI, que dá los resultados de las pruebas realizadas con tales microbacterias. En este caso, fueron empleados como medio de ensayo, tubos con el medio de cultivo líquido de Dubos. El antibiótico fué añadido al medio de los diversos niveles indicados en la primera columna del cuadro.

Los tubos del medio, conteniendo dichos niveles o concentraciones del antibiótico, fueron sembrados después del cultivo de las diversas microbacterias especificadas, cuya identidad está indicada en la cabeza de cada una de las columnas del cuadro. La prueba fué llevada a cabo incubando los tubos, en condiciones estériles durante 26 horas y examinándolo después para determinar la presencia o ausencia de desarrollo de las microbacterias. La falta de desarrollo en los tubos, al final del periodo de pruebas, se indica con un signo (-) y la presencia con un signo (+).



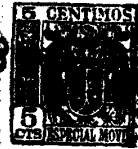
CUADRO VI

Actividad del P.A. 105 contra Microbacterias

	<u>Mcg./ml.</u>	<u>renae</u>	<u>phlei</u>	<u>amegnetis</u>	<u>607</u>
5	25,0	-	-	-	-
	12,5	-	-	-	-
	6,25	-	-	-	-
	3,12	-	-	-	-
	1,56	-	-	-	-
10	0,78	+	+	+	+
	0,39	+	+	+	+
	0,19	+	+	+	+

Se ha comprobado que el antibiótico P.A. 105 posee un nivel de toxicidad relativamente bajo cuando se ensaya sobre animales. Por ejemplo, el valor  $LD_{50}$ , cuando el inhibitorio se administra intravenosamente a ratones en solución acuosa, es, aproximadamente de 15 mg/20 gramos ratón. La toxicidad para otras especies o por otras vías de administración, es comparable. También se ha visto que el antibiótico P.A. 105 posee un elevado orden de actividad in situ sobre diversos organismos patógenos. Ratones de peso aproximadamente uniforme infectados intraperitonealmente con ciertas cepas de Strep. hemolyticus, D. pneumoniae y M. pyogenes var. aureus y tratados por el antibiótico en inyección subcutánea, con dos dosis diarias de 5 mg. durante dos días y medio. La eficacia del antibiótico P.A. 105 contra esos organismos, en los ratones tratados del modo descrito, se pone de relieve en el cuadro VII en el que se compara el porcentaje de super-vivencia de los ratones tratados y no tratados.

226255



CUADRO VII

"Actividad del P.A. in vivo

<u>Organismo</u>	<u>Animal: Tratado: No tratado</u>	<u>48 horas</u>	<u>96 horas</u>	<u>7 días</u>
5 Strep. hemo 0203Mv	Tratado	100	100	100
	No tratado	0	0	0
D. pneumoniae 1/230	Tratado	100	100	90
	No tratado	0	0	0
10 M. pyogenes var. aureus Nº. 235	Tratado	100	100	100
	No tratado	20	20	20

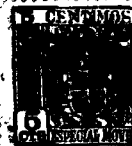
El invento incluye en su ámbito un procedimiento para el cultivo del microorganismo S. antibioticus. El

15 cultivo de este microorganismo tiene lugar, de preferencia, en medios nutritivos acuosos a una temperatura de unos 24-30°C. en suspensión y en condiciones de agitación y aireación. Los

medios nutricios adecuados para este proceso contienen un hidrato de carbono, tal como azúcares, almidón, glicerina, harina

20 de maiz y un manantial de nitrógeno orgánico tal como caseína, harina de soja harina de cacahuet, gluten de trigo, harina de semillas de algodón, lactobúmina, producto de la digestión enzimática de la caseína, triptona. También pueden ser utilizados, con resultados satisfactorios para el cultivo, otras

25 sustancias como los productos solubles de destilería extracto de levadura, residuos de la fermentación de melazas, así como sales minerales como cloruro sódico, fosfato potásico, nitrato sódico, sulfato magnésico y minerales traza como el cobre cinc y hierro.



Si durante la fermentación se produce espuma en exceso, se pueden añadir al medio de fermentación agentes antiespumantes, tales como aceites vegetales. El pH de la fermentación tiende a permanecer bastante constante pero si  
5 aparecen variaciones, puede añadirse al medio un agente tampón tal como el carbonato cálcico.

La siembra para la preparación del antibiótico P.A. 105 mediante cultivo del S. antibioticus puede conseguirse empleando cultivos obtenidos en medios tales como el agar  
10 de Emerson o caldo con lactosa. El cultivo puede ser empleado para sembrar en frascos de agitación o en tanques de siembra para desarrollo en sumersión, o, alternativamente, los tanques pueden ser sembrados a partir de los frascos de agitación. El desarrollo del microorganismo alcanza generalmente su máximo, en dos o tres días. Sin embargo, pueden influir en la velocidad con la cual se alcanza la máxima actividad, las variaciones en el equipo que se utilice, la velocidad de aireación, la velocidad de agitación, etc. En general, entre 24 horas y cuatro días, es período deseable para producir el antibiótico. La aireación del medio en los  
20 tanques para cultivo en sumersión, se mantiene aproximadamente a razón de medio a dos volúmenes de aire libre por volumen de caldo por minuto. La agitación puede ser mantenida por tipos adecuados de agitación, familiares a los que se dedican a la industria de fermentación. Como es natural, durante  
25 todo el proceso de siembra y durante todo el desarrollo, hay que mantener condiciones de asepsia.

Una vez desarrollado el microorganismo, el micelio

22 6255

que por lo general es abundante y fino, puede ser separado del caldo de fermentación mediante los varios tipos de quipos conocidos, tales como filtro-prensa, centrífugas, etc. El antibiótico F.A. 105 puede ser recuperado del caldo de fermentación por diferentes procedimientos. Alternativamente, todo el caldo puede ser empleado tal como está o puede ser desecado. El antibiótico puede ser purificado ulteriormente de diversas maneras: por ejemplo, el compuesto puede ser extraído de la solución acuosa con pH neutro o ligeramente alcalino, preferentemente entre 6 y 10, aproximadamente, mediante una variedad de disolventes orgánicos no miscibles con el agua, incluyendo éteres, hidrocarburos aromáticos, ésteres, cetonas, alcoholes inferiores e hidrocarburos halogenados. Ejemplos de estas sustancias son: éter dielílico, benceno, tolueno, acetato de etilo, acetato de butilo, metil isobutil cetona, butanol y cloroformo. Incluso con pH ácidos, algunos de estos disolventes extraen cantidades apreciables de antibióticos. Esto es particularmente cierto con los alcoholes no miscibles con el agua, tales como el butanol, los pentanoles,, etc. El antibiótico puede ser extraído de nuevo de la mayoría de las soluciones disolventes, empleando agua acidificada, preferiblemente con un pH por lo bajo de 2,5. Si se desea, el extracto de disolvente puede concentrarse antes de extracción de agua acidificada. Ajustando el pH a neutralidad o alcalinidad, el antibiótico puede ser extraído otra vez por uno de los disolventes indicados anteriormente. Después de desecado el disolvente y concentrada la solución, el antibiótico cristaliza en largas agujas blancas. El producto puede ser

226255



re cristalizado por enfriamiento de una disolución del mismo acetato de etilo caliente, cloroformo, cloruro de metileno o dicloruro de etileno. Otros métodos de recuperación que se sugieren por si mismos, comprenden la adsorción por carbón vegetal con la elución subsiguiente, el tratamiento con resinas de cambio de iones o el empleo de columnas de alúmina.

El antibiótico P.A. 105 es un compuesto orgánico amórfico, básico, blanco, solubles en los ácidos acuosos diluidos y moderadamente, soluble en el agua. Es muy soluble en cierto número de disolventes orgánicos, tales como el alcohol metílico, alcohol metílico, acetona de butanol. Es insoluble en hexano, tetracloruro de carbono y éter di-n-butílico. Una solución acuosa del compuesto conserva su estabilidad durante varias horas, a la temperatura de la habitación, dentro de un amplio campo de pH, y, sin embargo, es muy inestable si se calienta en solución ácida. Es estable en estado seco o disuelto en disolventes anhidros. El clorhidrato del antibiótico anhidro, c-ristalino, tiene un punto de fusión de unos 125-128°C. Presenta un pico de baja intensidad, ancho en la región del ultravioleta, alrededor de los 286-289 m/ $\mu$  (10 mg. en 10 ml. de metanol). Disuelto en cloroformo, la base de antibiótico presenta un cierto número de picos característicos en la región del infra-rojo, cuyas frecuencias más insignificativas (en centímetros recíprocos) son los siguientes: 3510, 2910, 2890, 2840, 2590, 2540, 2590, 1710, 1615, 1460, 1385, 1305, 1280, 1190, 1160, 1145, 1110, 1075, 1050, 985, 960, 935, 895 y 860. En suspensión en



una perla de bromuro potásico, el clorhidrato anhidro presenta asimismo un cierto número de picos característicos en la región del infra-rojo, teniendo los más significativos las siguientes frecuencias: 3880, 2930, 2880, 1710, 1640, 1465, 1380, 1330, 1250, 1190, 1160, 1115, 1075, 1055, 1010, 1000, 985, 935, 865 y 828. El espectro infrarojo viene representado con más detalle en los dibujos que se acompañan. El clorhidrato disuelto en metanol (C, 1%) tiene un  $D_{25}^{25} -80^{\circ}$ .

El peso molecular del antibiótico base P.A. 105, determinado por el método ebulloscópico, resultó ser, aproximadamente, 715.

En una muestra de clorhidrato cristalino de P.A. 105, que había sido cristalizado desde acetato de etilo y que fué desecado a  $100^{\circ}$  durante 18 horas, se observó una pérdida de peso del 5%. El material desecado fué analizado y se encontró que contenía los siguientes elementos, en proporciones en peso que se especifican:

Carbono . . . . .	57,63
Hidrógeno . . . . .	8,73
Nitrógeno . . . . .	1,87
Cloro (iónico) . . . . .	4,30
Oxígeno (por diferencia) . . . . .	27,47

Esto corresponde a la probable fórmula empírica  $C_{37}H_{67}NO_{13} \cdot HCl$  para el clorhidrato anhidro. El clorhidrato se presenta también en varias formas hidratadas, tales como el hidrato que corresponde a la probable fórmula empírica  $C_{37}H_{67}NO_{13} \cdot HCl \cdot 2H_2O$ .

El antibiótico P.A. 105 se distingue claramente de otros antibióticos por sus propiedades, como quedan evidenciadas por las descritas anteriormente y por las me-



5 didas cromatográficas sobre papel. Pueden prepararse sales útiles del antibiótico siguiendo métodos bien conocidos en la industria, tales como tratamiento de la base con un ácido adecuado en solución acuosa o en condiciones anhidras. Por ejemplo, el clorhidrato puede ser preparado disolviendo la base en acetona y pasando este ácido clorhídrico gaseoso por la disolución. También pueden ser empleados otros ácidos, tales como el sulfúrico o fosfórico para obtener las correspondientes sales ácidas del antibiótico.

10 El invento viene además aclarado por los siguientes ejemplos que no deben ser considerados como imponiendo limitaciones de ninguna clase.

Ejemplo I

15 Un cultivo inclinado de S. antibioticus ATCC 11891 sobre agar de Emerson fué cultivado en condiciones controladas, para que desarrollase esporas con el fin de sembrar un medio nutricio de la siguiente composición.

- 20 Cerelesa . . . . . 10 gramos
- Harina de soja . . . . . 10
- Cloruro sódico . . . . . 5
- Solubles de destilería . . . . . 5
- Carbonato cálcico . . . . . 1

25 Esta mezcla de sustancias nutricias fué diluída con agua hasta el volúmen de un litro, ajustado el pH a 7 con hidróxido potásico y esterilizada por calor. El medio fué enfriado después y se le añadieron las esporas en condiciones de asepsia. El cultivo del organismo fué llevado a cabo en frascos de agitación a unos 25°C durante un periodo de dos días. La mezcla de caldo y micelio así formada, fué transferida después a 20 veces su volúmen de un medio de fer-

30

mentación estéril de la composición siguiente:

	Cerelesa . . . . .	10	gramos por litro
	Cloruro sódico . . . . .	5	
	Curbay Bg . . . . .	5	
5	Almidón de maíz . . . . .	10	
	Harina de soja . . . . .	10	

Este medio fué ajustado a un pH 7 con hidróxi-  
do potásico, tratado por un gramo de carbonato cálcico por li-  
tro y esterilizado de la manera usual antes de transferir él,  
10 el caldo y el micelio. Después de sembrar el medio con el  
organismo procedente de los frascos de agitación, la mezcla  
fué sujeta a agitación y aireación, en condiciones estériles,  
durante tres días. En este punto, se encontró que la poten-  
cia del caldo era de 70 mcg./ml. Se quitó el micelio por fil-  
15 tración y se extrajo 2 veces con un cuarto de volúmen de me-  
til-isobutil cetona. Las fases disolventes combinadas fueron  
concentradas al vacío, a un décimo de su volúmen. El antibió-  
tico fué extraído después en agua ajustada a un pH 2, aproxi-  
madamente, con ácido sulfúrico. Se separó la fase acuosa, se  
20 lavó con benceno para quitar la metil-isobutil cetona y se  
ajustó a un pH de 6,5. Después se extrajo varias veces el  
antibiótico con éter, en el cual fué desecado sobre sulfato  
sódico anhidro. La separación del éter por destilación, dió  
lugar a la cristalización del antibiótico en forma de largas  
25 agujas blancas. Finalmente, el producto fué recrystalizado  
desde acetato de etilo caliente. El producto recrystalizado  
obtenido de esta manera resultó de elevada eficacia contra  
varias microbacterias y microorganismos Gram-positivos, como  
se indica en las pruebas descritas anteriormente.

30

#### Ejemplo II

Se preparó otro medio de fermentación con las si-



güientes sustancias:

	Harina de soja . . . . .	15 gramos
	Cerelesa . . . . .	20
	Almidón de maiz . . . . .	10
5	Cloruro de sodio . . . . .	5
	Solubles de destilería . . . . .	5
	NZ Amina B . . . . .	5

Estas sustancias fueron añadidas a un litro de agua y el pH de la mezcla resultante fué ajustado entre 7 y 7,2 con hidróxido potásico. Se adicionaron cinco gramos de carbonato de calcio para que actuase como tampón durante la fermentación. El medio fué esterilizado en autoclave y sembrado en condiciones estériles con S. antibioticus preparado de acuerdo con el procedimiento expuesto en el Ejemplo I.

Después de someter al medio sembrado a aireación y agitación en condiciones estériles, a unos 23°C durante dos días, se encontró que el caldo filtrado contenía 100 microgramos de antibiótico P.A. 105 por ml. de solución.

-----  
 ---- N O T A ----  
 -----

Los puntos de invención propia, no nueva, pero no establecida, practicada ni divulgada en España, que se pre-

sentan para que sean objeto de esta Patente de Introducción, son los siguientes:

5 1º. Un procedimiento para producir un nuevo antibiótico (aquí designado como P.A. 105) que comprende el cultivo del Streptomices antibioticus ATCC 11891 como aquí se describe o una mutación u otro equivalente del mismo en un medio nutricio acuoso en condiciones de inmersión aerobias hasta que se comunique a dicho medio actividad antibacteriana sustancial.

10 2º. Un procedimiento conforme a la reivindicación 1, en la cual, el cultivo es llevado a cabo en un medio nutricio acuoso, en condiciones de inmersión aeróbicas y de agitación, a una temperatura desde unos 24º a 30º C, durante un periodo de un día a unos cuatro días.

15 3º. Un procedimiento conforme a la reivindicación 1 ó 2, que incluye la operación de recuperar del caldo de fermentación el antibiótico producido.

20 4º. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 3, según el cual, el antibiótico es recuperado por filtración del caldo y extracción de éste con un disolvente orgánico no miscible con agua en condiciones de pH neutro a alcalina.

25 5º. El procedimiento para producir el antibiótico P.A. 105 sustancialmente como se expone en los Ejemplos I y II.

6º. Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º., en el cual se produce una sustancia básica eficaz para la inhibición del desarrollo de bacterias Gram-positivas



y microbacterias y capaz de formar sales con ácidos cuya sustancia básica es moderadamente soluble en disolventes orgánicos: cuyo clorhidrato cristalino seco contiene los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno, cloro y oxígeno sustancialmente en las siguientes proporciones en peso.

5

Carbono . . . . .	57,63
Hidrógeno . . . . .	8,73
Nitrógeno . . . . .	1,87
Cloro (iónico) . . . . .	4,30
Oxígeno (por diferencia) . . . . .	27,47

10

cuyo clorhídrico cristalino, seco, presenta un ancho pico de baja intensidad aproximadamente en los 286-289 m/u de la región ultravioleta del espectro y cuando está suspendido en una perla de bromuro potásico, presenta absorción característica en la región infra-roja a las siguientes frecuencias expresadas en centímetros recíprocos: 3380, 2930, 2880, 1710, 1640, 1465, 1380, 1330, 1250, 1190, 1160, 1115, 1075, 11055, 1010, 1000, 985, 935, 865, 828 y las sales ácidas de dicha sustancia, verbi-gracia, el clorhidrato.

15

20

7°. Un procedimiento para producir un nuevo antibiótico.

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

25

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

Madrid 53 MAY 1956

P. A.  
*[Handwritten signature]*

SPAIN

920255

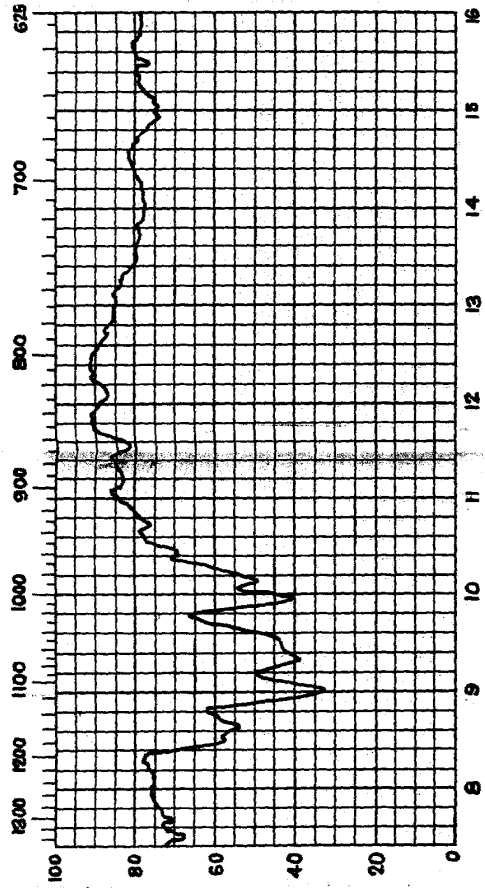
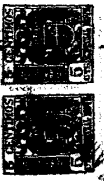


FIG. 1.

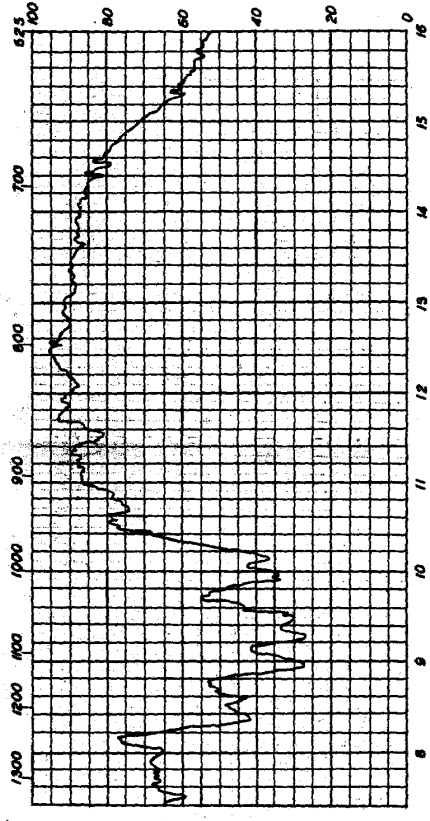


FIG. 2

*Handwritten signature*