



229318

Memoria Descriptiva

para

una Patente de Invención
por veinte años en España
a favor de

The Upjohn Company
(sociedad de EE. UU.)

residente en

Kalamazoo (Michigan) - Estados Unidos -
301 Henrietta Street

por:

" UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS "

Prioridad solicitud patente norteamericana Serial nº
516.742 del día 20 de Junio de 1.955

INVENTORES: Sres. Alma Dietz, Clarence DeBoer, Charles
Giles Smith, Malcolm Edward Bergy, y
Herman Hoeksema;
todos súbditos de Estados Unidos.

19
229318

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar antibióticos. Más en particular, se refiere la invención a un procedimiento para producir un antibiótico que se llamará aquí el antibiótico 66-A, empleando los métodos de fermentación, y a un método para recuperar y concentrar el mismo a partir de una solución bruta, a su purificación y a sus derivados y la producción de éstos.

Una finalidad de la invención es la de proporcionar un antibiótico nuevo y útil, que posee actividad frente a bacteria gram-positiva y gram-negativa. Otra finalidad de la invención es la de proporcionar derivados de este antibiótico, útiles para esos fines. Otra finalidad es la de proporcionar un procedimiento para producir y recuperar este antibiótico. Otras finalidades y características del presente invento se pondrán en evidencia y serán comprendidas por las personas familiarizadas con esta materia.

Se ha descubierto que cultivando bajo condiciones fiscalizadas y sobre medios nutritivos de cultivo apropiados, una especie de microorganismo hasta ahora no descrita, o sea el *Streptomyces niveus*, aislado de una muestra de tierra sacada de Queens Village, Nueva York, Estados Unidos de América, se obtiene un nuevo compuesto, o sea el antibiótico 66-A. Un cultivo del microorganismo vivo ha sido depositado en la Fermentation Division (Departamento de Fermentación) del Northern Regional Research Laboratory (Laboratorio Regional Septentrional de Investigaciones) de Peoria, Estado de Illinois, Estados Unidos de Nor



229318

teamérica, habiéndose agregado el mismo a la colección permanente de dicho laboratorio bajo el nombre NRRL 2466.

Un estudio detenido de la morfología y fisiología del *S.Niveus* comprueba que el mismo es diferente de cualquiera de las especies anteriormente descritas de estreptomices en el "Manual of Determinative Bacteriology" de Bergey, 6a. edición páginas 929 a 977, y "Actinomycetes and their Antibiotics" de Wakeman y Lechevalier. Las características del microorganismo figuran en la Tabla 1. Todas las siembras se efectuaron con un inculado vegetativo que se hizo crecer en 100 mililitros de un caldo de extracto de levadura-triptona, sobre un agitador de vaivén a una temperatura de 28°C. Después de 24 horas, el inculado fue mezclado (Waring Blender) durante un minuto y se agregó luego 0,2 mililitro del inculado a cada tubo de prueba. Se tomaron los datos respectivos a los 4, 7 y 14 días.

Tabla I

Características del cultivo del *S.Niveus*.

I. Medio (temperatura de incubación, 28°C; gelatina 24°C).

II. Crecimiento vegetativo.

III. Crecimiento aéreo.

IV. Observaciones.

	I	II	III	IV
Gelatina simple		†	-	Licuação a 1/3 de la profundidad del medio.
Gelatina nutritiva		†	-	Licuação 1/3 de la profundidad del medio.
Agar nutritivo		†	claro; blanco grisáceo	Crema del lado inverso; pigmentación amarilla ligera.



229318

	I	II	III	IV
5	Caldo nutritivo	† anillo alrede - dor de la super ficie; crecimen to floculento en el fondo	blanco de nie ve hasta de ce niza.	
	Caldo de d-glu- cosa	† anillo y pelícu la en la superfi cie; crecimiento floculento en el fondo	blanco de nie- ve hasta de ce niza	
10	Agar de d-glu - cosa	†	blanco de nie ve hasta de ce niza	Amarillo del lado inverso; pigmento ama rillo.
	Caldo de tripto na	† película en la su perficie; creci - miento floculento en el fondo.	blanco de nie- ve hasta de ce niza.	
15	Caldo de extrac to de levadura/ triptona	† película en la su perficie; creci - miento floculento en el fondo.	blanco de nie- ve hasta de ce niza.	
	Agar de tirosi- na según Waksman		ligeramente blanco grisá - ceo.	Crema del la- do inverso; pocos pigmen tos amarillos.
20	Caldo de tirosina	† crecimiento flo - culado en el fon do.	-	buen color ro sa
	Agar de suprosa de Czapek	†	blanco-crema	crema del la- do inverso; pocos pigmen tos amarillos.
25	Leche de litmo	† anillo alrededor de la superficie.	-	pepteniza - ción
	Caldo nutritivo de nitrato	† película en la su perficie; creci - miento floculento en la base.	blanco de nieve; no se redu- jeron hasta de ceniza los ni- tratos.	



229318

	I	II	III	IV
5	Caldo sintético de nitrato	+ anillo alrededor de la superficie; crecimiento floco - lento en todas partes y en la base.	poco; blanco	no se redujeron los nitratos
	Agar de hierro/peptona	+ crecimiento pobre; crecimiento tiene color del medio.	-	no se oscurece el H ₂ S; color inverso es el del medio; pocos pigmentos amarillos.
10	Agar de Bennett	+	bien; blanco de crema	inverso amarillo; pigmento amarillo.
	Agar de malato cálcico	+	blanco de crema	inverso crema; poco pigmento amarillo.
15	Agar maltosa/triptona	+	blanco de crema	inverso amarillo; pigmentos amarillos.
	Almidón de ca - seína	+	crema	inverso crema; hidrólisis buena.
	Almidón nutritivo	+	rosa cremosa	inverso amarillo; hidrólisis buena.
20	Agar A de almidón según Waksman	+	crema	inverso crema; hidrólisis pobre.
	Agar B de almidón según Waksman	+	crema	inverso crema; hidrólisis buena.

25 Nota: + significa crecimiento; y - significa ningún crecimiento.

La utilización de compuestos de carbono por S. niveus en un medio sintético se ilustra en la Tabla II. Se empleó el método de Pridham y Gottlieb, J. Bact. 56.107-114 (1948), con



229318

las siguientes modificaciones:

1) Se inocularon frascos con agitaci3n con una muestra de una provisi3n de tierra de S.niveus. Se incubaron los frascos a 28°C sobre agitadores de vaiv3n.

2) Pasadas 120 horas, se decant3 la capa sobreflotante. El crecimiento vegetativo fu3 lavado con 100 mililitros de agua destilada est3ril y se volvi3 a decantar la capa sobreflotante. Se agregaron luego 100 mililitros de agua destilada est3ril al crecimiento vegetativo lavado, y los frascos con la mezcla contenida en ellos fueron colocados sobre un agitador de vaiv3n e incubados a 28°C.

3) Despu3s de haber pasado otras 48 horas, se decant3 la capa sobreflotante. El crecimiento vegetativo fu3 lavado de acuerdo con lo ya descrito, y mezclado (Waring Blender) durante un minuto en 100 mililitros de agua destilada esterilizada.

4) Los trozos de agar fueron sembrados con 0,2 mililitros del inculado mixto.

Tabla II

Asimilaci3n de compuestos de carbono por S.niveus en el medio sint3tico de Fridham y Gottlieb.

Medio	Resultado	Medio	Resultado
Control	†	inulina	†
d-xilosa	†	almid3n soluble	†
l-arabinosa	†	glicerol	†
rannosa	†	dulcitol	†
d-fructosa	†	d-manitol	†
d-galactosa	†	d-sorbitol	⊕
d-glucosa	†	dl-inositol	†
d-manosa	†	salicina	†
maltosa	†	formato de Na	⊕
sucrosa	†	oxalato de Na	†
lactosa	†	tartrato de Na	†
celobiosa	†	salicilato de Na	†



229318

Medio	Resultado	Medio	Resultado
rafinosa	†	acetato de Na	†
dextrina	†	cittrato de Na	†
fenol	-	succinato de Na	†
cresol	-		

† significa asimilación positiva.

- " " negativa.

⊕ " " positiva, con crecimiento solamente ligero.

5

10

15

20

25

El cultivo de *S.niveus* produce micelios filamentosos ramificados. Los conidióforos que surgen de los micelios aéreos son derechos en su base y tienen enrollamientos en forma de tirabuzón en su parte superior. Las ramas fértiles se encuentran en racimos y llevan conidias alargadas. Cuando crecen sobre agar de Bennett (quinze días de incubación a 28°C), las colonias tienen tejidos similares a los de cuero, con una periferia compacta. El área esporulante es de color blanco cremoso; al revés es de color amarillo-cremoso ("yellow-cream", Maerz y Paul, "A Dictionary of Colours", 2ª Edición, McGraw-Hill Book Co., 1950, lámina 10, A-1, página 43, y lámina 11, F-4, página 45). Se producen buen crecimiento y esporulación a temperaturas entre aproximadamente 24 y aproximadamente 32°C. Sobre el agar de Bennett, no existe ningún crecimiento a 37°C.

Aunque en algunos aspectos el *S.niveus* es similar al *S.albus* (NRRL B-1333) y *S.cellulosae* (ATCC 3313), sus rasgos de cultivo, según se indica en la Tabla III, se distinguen de los de estos microorganismos.

Tabla III

Rasgos distintivos del *S.niveus*, *S.albus* NRRL B-1333 y *S.cellulosae* ATCC 3313.



229318

- I. Medio
- II. S.niveus
- III. S.albus NRRL B-1333
- IV. S.cellulosae ATCC 3313

5

	I	II	III	IV
Agar de Bennett		ningún creci- miento a 37 ^o	buen crecimien- to, y esporula- ción a 37 ^o	buen creci- miento, poca esporulación a 37 ^o
10 Agar de <u>d</u> -gluco- sa		esporulación blanca de nie- ve hasta de ce- niza; inverso amarillo; pig- mento amarillo.	esporulación crema; inverso chartreuse; pig- mento amarillo.	esporulación crema-blanco; inverso ama- rillo-broncea- do; pigmento amarillo-bron- ceado.
15 Agar de tirosi- na Waksman		esporulación clara gris-blan- ca; inverso cre- ma; poco pigmen- to amarillo.	crecimiento ve- getativo pobre; ninguna esporu- lación; inver- so color del me- dio.	pobre creci- miento vege- tativo; ninguna esporulación; inverso color del medio.
Agar de almidón de caseína		esporulación crema; inverso crema.	ligera esporula- ción crema; in- verso amarillo.	esporulación crema-rosada; inverso amari- llo.

20

Asimilación de compuestos de carbono

	I	II	III	IV
ramnosa		†	-	⊕
<u>d</u> -fructosa		†	†	†
sucrosa		†	-	†
lactosa		†	†	†
rafinosa		†	-	(-)
inulina		†	-	(-)
dulcitol		†	-	(-)
25 <u>dl</u> Cinositol		†	-	(⊕)
Formato de Na		⊕	-	(-)
oxalato de Na		†	-	(-)
tartrato de Na		†	-	(-)

† significa asimilación

- " ninguna asimilación.



229318

- (+) significa asimilación negativa -crecimiento solamente ligero.
(-) " crecimiento ligero - ninguna asimilación.

El *S. niveus* puede producir el antibiótico 66-A que es un material antibiótico eficaz, sólo cuando se cultiva bajo condiciones adecuadas y en un medio nutritivo sintético apropiado y preferentemente un medio nutritivo que contiene un hidrato de carbono asimilable como también un compuesto orgánico de nitrógeno. Cuando se agregan esporas de *S. niveus* a tierra recién recogida y se incuba la tierra inoculada, a 28°C durante seis días, no se encontró pruebas de actividad antibiótica en el extracto acuoso. Si bien existe una cantidad de medios apropiados disponibles se prefieren, por razones de economía de producción rendimientos máximos en antibiótico 66-A, y facilidad de su aislamiento, determinados medios de cultivo. Por ejemplo, las fuentes de hidratos de carbono en el medio nutritivo, que se prefieren actualmente, son glucosas, y/o una mezcla de glucosa y almidón. Otras fuentes apropiadas son maltosa, lactosa, glicerol y sus similares. La fuente de nitrógeno preferida es la materia soluble de destilerías (efluente secado de alambiques con pantallas obtenido de la fermentación de levadura), más existen otras fuentes apropiadas tales como tortas de semillas de algodón, tortas de porotos de soja, extracto de carne, proteínas de leche, y sus similares, que dan resultados satisfactorios.

Las sales inorgánicas nutritivas que se pueden incorporar ventajosamente en el medio, incluyen las sales capaces de ceder iones tales como sodio, potasio, calcio, fosfato, sulfato y sus similares. Las fuentes de nitrógeno inorgánicas ta-



22 93 18

les como sales de nitrato o sales de amonio pueden ser igualmente empleadas. Elementos de vestigio esenciales tales como magnesio, manganeso, cinc, hierro y sus similares, pueden incluirse también en el medio de cultivo para hacer crecer el *S.niveus*. Tales elementos de vestigio se suministran comúnmente en forma de impurezas accidentales al aditamento de los demás constituyentes del medio.

Para obtener un crecimiento y desarrollo máximos de *S.niveus*, el medio de cultivo antes de la inoculación del microorganismo, deberá ajustarse a un pH entre aproximadamente 7,5 y 8,5 y de preferencia a un pH superior a 8,0.

Condiciones de cultivo aeróbicas sumergidas con las condiciones preferidas para la producción de grandes cantidades de antibiótico 66-A. Para preparar cantidades limitadas del antibiótico, pueden emplearse frascos con agitación y cultivos en la superficie en botellas. Si se efectúa el crecimiento en grandes recipientes o tanques, es preferible utilizar la forma vegetativa del microorganismo para la inoculación a fin de evitar un largo vacío en la producción del antibiótico y la consiguiente utilización ineficaz del equipo. De ahí que es deseable producir primeramente un inoculado vegetativo del microorganismo, inoculando una cantidad relativamente pequeña del medio de cultivo con una forma de esporas del microorganismo y cuando se haya obtenido un inoculado vegetativo joven y activo, se transfiere éste en condiciones asépticas a grandes recipientes o tanques. El medio en el cual se produce el inoculado vegetativo, puede ser el mismo que el utilizado para la producción del antibiótico, o puede ser distinto de éste.



229318

Se pueden obtener rendimientos óptimos en antibiótico 66-A cuando se mantiene el medio de cultivo a una temperatura entre aproximadamente 24^o y 32^oC, y preferentemente a aproximadamente 28^oC.

5 El procedimiento objeto de la presente invención no se limita a la producción del antibiótico 66-A por medio del *S.niveus* o microorganismos que correspondan plenamente a la descripción que se acaba de hacer solamente a título ilustrativo. Se debe comprender que los procedimientos fermentativos de la presente invención abarcan también otras capas de *S.niveus* productores del antibiótico 66-A, siendo estas otras capas fácilmente producidas y aisladas por métodos rutinariamente aplicados para modificar las capas y aislarlas, los cuales incluyen la selección de organismos cultivados, que se exponen a medios modificadores tales como rayos X, luz ultravioleta, agentes químicos tales como mostazas de nitrógeno y sus similares.

10 Durante el período de crecimiento del microorganismo se pueden verificar fácilmente el régimen de producción de antibiótico 66-A y la concentración del antibiótico en el medio de cultivo, haciendo las pruebas correspondientes con muestras del medio de cultivo, para determinar su actividad antibiótica frente a un organismo que se conoce como susceptible de la actividad del antibiótico, p.ej. *K.pneumoniae*. Para estas verificaciones se emplea convenientemente una prueba que comprende efectuar diluciones en series de las muestras del cultivo, agregar por 15 ciones de las muestras diluídas a agar nutritivo derretido, solidificar el agar en un plato petri, inocular éste con un cultivo joven de *K.pneumoniae*, y determinar el mayor grado de dilución del medio de cultivo que haya ocasionado la inhibición completa



229318

del crecimiento del microorganismo sobre el agar nutritivo.

5 Se puede verificar la producción del antibiótico 66-A también mediante los métodos de pruebas turbidimétricas comúnmente empleados con relación a la producción de otros antibióticos. En general, la producción máxima del antibiótico después de la inoculación del medio de cultivo tiene lugar entre aproximadamente dos y aproximadamente seis días cuando se emplean cultivos aeróbicos sumergidos.

10 Se puede recuperar el material antibiótico del medio de cultivo empleando la técnica extractiva o adsorbente, incluso la adsorción del antibiótico sobre resinas intercambiadoras de iones tales como Permutit DR, y sus similares, o se puede eluir el material antibiótico con agentes eluidores apropiados tales como alcalinos inferiores acuosos. Se prefieren los procedimientos de extracción para la producción industrial, debido a
15 que éstos insumen menos tiempo y son menos costosos.

20 Un procedimiento adecuado de recuperación incluye acidificación del medio nutritivo fermentado y secar luego el precipitado resultante. Alternativamente, se puede disolver el precipitado en un medio acuoso, secándose la solución por congelación, para obtener la actividad antibiótica bajo la forma de una sal.

25 Un procedimiento extractivo preferido para recuperar del medio nutritivo fermentado la actividad antibiótica, comprende añadir un solvente orgánico inmiscible con agua, p.ej. un acetato de alcohol inferior o alquilo inferior, cetona de alquilo inferior y su similar a dicho medio, concentrar el extracto en el solvente, a un volumen relativamente pequeño y precipi-



22 93 18

tar el material antibiótico del solvente, agregando un solvente miscible, en el cual el antibiótico es poco soluble. El antibiótico se obtiene entonces bajo una forma amorfa.

5 Una realización concreta y preferida del método para aislar el antibiótico 66-A, incluye filtrar el caldo entero a un pH entre aproximadamente 7 y aproximadamente 10 y de preferencia a un pH de aproximadamente 8, ajustar el pH del filtrado a un valor entre aproximadamente 2 y aproximadamente 7 y de preferencia a un pH de aproximadamente 6, con un ácido mineral tal como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, con un ácido fosfórico, 10 o sus similares y extraer el material antibiótico con un solvente adecuado tal como un acetato de alcoilo inferior y preferentemente acetato de amilo, acetato de etilo y sus similares. Solventes apropiados son también entre otros, los alcanoles de peso molecular inferior, tales como n-butanol, alcohol n-amílico, alcohol iso-amílico y sus similares, cetonas miscibles con agua, tales como cetona metil isobutílica, cetona metil isopropílica y sus similares. Se concentra el extracto por destilación al vacío o mediante otros recursos apropiados, agregándose el extracto así 15 obtenido a un solvente constituido por un hidrocarburo que tenga cuatro y ocho átomos de carbono, vale decir, un solvente Skellysolve, y preferentemente un solvente constituido por un hidrocarburo que posee 6 ó 7 átomos de carbono, tal como hexano o heptano. El material activo es así precipitado y secado para obtener un 20 producto parcialmente purificado. El producto puede purificarse 25 ulteriormente por cristalización desde una solución de acetona en agua, a un pH ácido, tal como p.ej. inferior a aproximadamente 4.

El ácido libre del antibiótico A-66 posee las si -



229318

güentes propiedades físicas y químicas:

una rotación óptica $[\alpha]_D^{23-28} = -63^\circ$ (c, 1% etanol absoluto, 2 decímetros).

El antibiótico 66-A en forma cristalina exhibe dos puntos distintos de fusión y de descomposición. Una de estas formas o sea la forma 1, funde entre 174 y 178°C, y la otra forma o sea la forma 2, funde entre 149 y 151°C. La forma 1 del antibiótico 66-A cristalino se distingue por los siguientes datos de difracción con rayos X:

	<u>2 θ</u>	<u>Espaciamientos interplanares, Å</u>
	6.16	14.34
	9.02	9.79
	11.52	7.67
	13.18	6.71
15	14.33	6.17
	15.88	5.58
	23.10	3.85
	25.90	3.44
	42.28	2.14
20	49.05	1.86

La forma 2 del antibiótico 66-A cristalino se distingue por los siguientes datos de difracción de rayos X:

	<u>2 θ</u>	<u>Espaciamientos interplanares, Å</u>
	7.27	12.16
25	12.27	7.21
	14.63	6.05
	21.14	4.20
	23.65	3.76



229318

<u>2θ</u>	<u>Espaciamientos interplanares, Å</u>
25.95	3.43
28.21	3.16

5 Se obtuvieron estos datos mediante el método con polvo, utilizando una unidad de difracción de Picker-Waite, con radiación $K_{\alpha 1}$ de cobre filtrado por níquel.

Propiedades cristalográficas:

Sistema: Ortorómbico.

Clase: Dipiramidal rómbica.

10 Formas presentes: Macro prisma, 210
Domo corto, 013

Angulos entre las caras: 210 210 = 54,5°
013 013 = 144°

Razón axial: 0.513:1:0,324

15 Dimensiones de la célula de unidad: a = 13.56 Å
b = 26.38 Å
c = 8.54 Å

Signo óptico: negativo

Dispersión: extrema, R V

20 Orientación común: bisectriz aguda inclinada.

Indices de refracción: alfa 1,608
beta 1,638
gamma 1,654

Angulo axial óptico: 2 V = 71°

Orientación óptica: a = x
b = y

25 Refracción molar: $\sum \rho V = 1,633$; $M_r(D) = 164,23$; densidad = 1,3448
Peso molecular: mediciones con rayos X y cristalográficas ópticas indican un peso molecular de la unidad de 618,41.



229318

5 El antibiótico 66-A es muy soluble (100 mgs./ml) en agua a un pH superior a 9; su solubilidad disminuye hasta aproximadamente cero a medida que el pH vaya disminuyendo desde 9.0 hasta 5.0. El antibiótico es muy soluble en alcoholes inferiores y acetona.

Los análisis elementales del antibiótico 66-A dieron los siguientes valores:

<u>Elemento</u>	<u>Porcentaje</u>
Carbono	59,40
hidrógeno	6,44
nitrógeno	4,54

10 Basándose en los valores precedentes, se calcula la fórmula empírica para el antibiótico como $C_{30-32} H_{38-42} O_{11-12} N_2$.

15 Titulaciones electrométricas en agua indican la presencia de dos grupos ácidos: pK_{a1} (precipitado), $pK_{a2} = 9.1$. El espectro de absorción de ultra-violeta observado a una serie de valores pH (entre 1 y 7) en agua indican un valor pK_{a1} de 4,3. En dimetilformamida existen dos inflexiones: $pK_{a1} = 5,7$ y $pK_{a2} = 11,9$. El peso equivalente calculado para $C_{30}H_{38}O_{12}N_2=618$; comprobado 636,6.

20 Las investigaciones polarigráficas del ácido libre del antibiótico 66-A muestran que el compuesto no era reducible en el electrodo de mercurio goteado en soluciones de etanol-agua (1:1) que contiene H_2SO_4 al 0,001 N; $(CH_3)_4NCl$ al 0,05 N; ó KOH al 0,001 N, como electrolito de soporte. Las gamas de potencial cubiertas eran 0 a -1,5; 0 a -2,0; y 0 a -2,0 voltios contra S.CE. para las soluciones acídica, neutra y alcalina, res



229318

pectivamente.

El antibiótico 66-A cristalino es algo sensible a la luz, tornándose el mismo amarillo al exponerse y perdiendo algo de su bio-actividad. Soluciones a 4°C quedan estables durante sesenta días con un pH entre 2 y 10. Soluciones diluídas a 25°C durante sesenta días muestran las siguientes estabilidades determinadas en pruebas en vitro:

	<u>pH</u>	<u>vida media</u>
	2	>60 días (véase nota)
10	7,8	10 "
	10	60 "
	12	3 "

Nota: no hubo indicación alguna de ninguna pérdida de bio-actividad después de 60 días.

Utilizando un espectrofotómetro de cuarzo según Beckmann modelo DN, o un espectrofotómetro registrador Cary, el ácido libre del antibiótico 66-A cristalino (formas 1 y 2) tiene los siguientes espectros ultravioletas:

En una solución de etanol al 95% que contiene ácido sulfúrico 0,01 N (Fig. 1):

<u>Máximos</u>	<u>Inflexiones</u>
334, E 1 % 1 cm = 437,0	250, E 1 % 1 cm = 210,8
	262 E 1 % 1 cm = 192,8
	282 E 1 % 1 cm = 206,8
	304 E 1 % 1 cm = 273,1

En una solución de etanol al 95 % que contiene



229318

0,01 N hidróxido de potasio (Fig. 1):

<u>Máximos</u>	<u>Mínimos</u>	<u>Inflexiones</u>
1 %	1 %	1 %
311, E = 512,4	263, E = 162,5	237, E = 313,8
1 cm	1 cm	1 cm
		255 E = 205,4
		1 cm
		1 %
		287 E = 347,6
		1 cm

El espectro de características de absorción infrarroja (prisma de cloruro de sodio), del antibiótico 66-A cristalino, forma 1 (fig. 2) en suspensión en aceite mineral, exhibe bandas de absorción (expresadas en centímetros recíprocos) en las siguientes frecuencias: 3500, 3445, 3395, 1744, 1738, 1694, 1642, 1607, 1542, 1500, 1374, 1360, 1320, 1294, 1280, 1252, 1235, 1219, 1162, 1138, 1124, 1103, 1091, 1080, 1062, 1029, 1000, 969, 930, 904, 879, 846, 800, 789, 770, 755, 739 y 716.

El espectro de absorción infrarroja del antibiótico 66-A cristalino, forma 2 (Fig. 3) en suspensión de aceite mineral, utilizando un prisma de cloruro de sodio, exhibe bandas de absorción (expresadas en centímetros recíprocos) en las siguientes frecuencias: 3480, 3360, 3280, 1715, 1690, 1635, 1610, 1586, 1534, 1507, 1374, 1344, 1315, 1293, 1259, 1186, 1157, 1121, 1084, 1064, 1022, 998, 972, 934, 919, 837, 818, 809, 789, 781, 761, 753 y 741.

Las sales metálicas ácidas y/o neutras, incluso las sales de metales alcalinos y de metales alcalino-térreos, y las sales aluminicas del antibiótico 66-A son obtenidas, tratando una solución o suspensión acuosa del antibiótico con una o dos medidas equivalentes de una solución acuosa de una base tal



229318

5 como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido cálcico, hidróxido aluminico, o su similar, y secando ya sea por evaporación de la solución al vacío hasta sequedad, o bien por secado por congelación. Por ejemplo, cuando se trata un equivalente de una base metálica tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio, o su similar, con el antibiótico se obtiene la correspondiente sal monosódica, monopotásica, monocálcica, monoaluminica o su similar, del antibiótico 66-A. En forma análoga, al tratar el antibiótico con
10 dos equivalentes de una base metálica tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio o su similar, se obtiene la correspondiente sal neutra sódica, potásica, cálcica, aluminica o su similar, del antibiótico 66-A.

15 La sal disódica del antibiótico 66-A posee la fórmula empírica aproximada de $C_{30}H_{36}O_{12}N_2Na_2$;

Calculado: Na, 6,94;

Comprobado: Na, 6,77;

20 La sal dipotásica del antibiótico 66-A posee la fórmula empírica aproximada de $C_{30}H_{36}O_{12}N_2K_2$;

Calculado: K, 11,25;

Comprobado: K, 11,14;

25 El espectro característico de absorción infrarroja, al emplearse un prisma de cloruro de sodio, de la sal disódica del antibiótico 66-A, en una suspensión de aceite mineral, exhibe bandas de absorción (expresadas en centímetros recíprocos) en las siguientes frecuencias: 3360, 2190, 1718, 1645, 1605, 1525, 1465, 1425, 1377, 1325, 1265, 1217, 1132, 1115, 1084, 1022,



229318

995, 969, 955, 825, 797, 771, 740 y 717.

5 Para preparar las sales amínicas o amónicas del 66-A, se trata una solución del antibiótico en un solvente orgánico tal como metanol, etanol, propanol (incluso sus formas isoméricas, butanol (incluso sus formas isoméricas), y su similar, acetato de amilo y su similar, con un equivalente de amoníaco o de la amina deseada tal como bencilamina, di-n-propilamina, trietilamina, o su similar, para conseguir la correspondiente sal de amonio o amina tal como la sal amónica del antibiótico 66-A, 10 la sal bencilamínica del antibiótico 66-A, la sal di-n-propilamínica del antibiótico 66-A, la sal trietilamínica del 66-A y su similar. De manera análoga, se pueden preparar sales de adición del antibiótico 66-A, haciendo reacciones a este compuesto con otras aminas tales como la neomicinas (incluso neamina y 15 neomicinas B y C) eritromicinas A y B y sus similares.

20 Cuando se hace reaccionar el antibiótico 66-A con un diazoalcano, se obtiene el correspondiente compuesto alcoholado. Así por ejemplo, mediante su tratamiento con diazometano, se obtiene el compuesto metilado. Además, al reaccionar el antibiótico 66-A con un anhídrido o cloruro de un ácido orgánico, se obtienen los correspondientes acilatos del antibiótico. De este modo, mediante la reacción del antibiótico 66-A con anhídrido acético, se obtienen los correspondientes derivados acetilados.

25 El antibiótico 66-A y sus derivados se distinguen por un amplio espectro antibacterico. La actividad del antibiótico contra organismos ilustrativos se pone en evidencia en la siguiente tabla.



229318¹

Tabla IV
Espectro antibacterico - Concentración
Inhibitoria mínima (mcgs/ml)

	<u>Organismo de prueba</u>	<u>Concentración</u>
5	S. aureus	0,04-0,1
	S. hemolíticus	0,5
	S. tifosa	10
	K. pneumoniae	12,5
	P. multocida	1,0
10	L. mesenteroides	2,5
	L. citrovorum	25
	C. novu	25
	S. schottmuelleri	1000 ¹
	S. dispar	1000 ¹
15	D. pneumoniae	0,5
	B. subtilis	10 ²
	S. fecalis	10 ²
	S. albus	1
	S. cerevisiae	1000 ¹
20	S. marcescens	100 ³
	E. coli	1000 ¹
	A. aerogenes	1000 ¹
	P. aeruginosa	1000 ¹
	P. vulgaris	1000 ¹
25	A. tumefaciens	100
	X. campestris	100
	N. asteroides	100

Nota: inhibición completa.



229318

- 1 ninguna inhibición con 100 mcgs/ml
- 2 " " " " 1 mcg /ml
- 3 " " " " 10 mcgs/ml

5 En virtud del alto nivel de su elevada actividad
contra *L. mesenteroides*, o sea el organismo que ocasiona el atas
camiento de los conductos en las industrias de azúcar (Fundamen
tals of Bacteriology, de Frobisher, pág. 555, 3ª edición, 1944),
el antibiótico 66-A y sus derivados son útiles para remediar es
ta condición indeseada. El material antibiótico, en una concen-
10 tración de 1 a 10 mcgs/ml, se agrega a la solución de azúcar cru
da en la primera fase del procedimiento de refinación, y se hace
pasar a la solución por las etapas subsiguientes del procedimien
to de refinación. El antibiótico 66-A y sus derivados son también
útiles, por ejemplo, bajo la forma de un vacío (concentración de
15 0,5 a 5 mgs/ml), para el tratamiento de agallas en las plantas
de tubérculos, enfermedad que motiva el A. tumefactions y de la
enfermedad de marchitamiento del maíz, motivada por el *X. campe-*
tris.

20 El ácido libre del antibiótico 66-A incluso sus de
rivados, es útil para combatir muchas enfermedades motivadas por
infecciones bacteriales en animales y en el hombre. Para este
propósito, se asocia el antibiótico a una cantidad significativa
de un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser un ma-
terial sólido o polvo, o bien un líquido. Las composiciones co-
25 rrespondientes pueden afectar la forma de comprimidos, compri-
midos efervescentes, polvo, gránulos, cápsulas (de envoltorios du-
ros o blandos), suspensiones en aceites comestibles, suspensio-
nes acuosas, u otras formas dosificadas, que son particularmente



5 útiles para su administración por vía bucal. Los diluentes líquidos son empleados en condición estéril para su uso parenteral, vale decir, por inyección. Un vehículo de esta clase puede ser un solvente estéril o un vehículo suspensor estéril, que contiene un aceite inyectable o un coloide hidrófilo que contiene agua, tal como carboximetilcelulosa sódica, metil celulosa, pirrodilona de polivinilo, gelatina, tragacanto y sus similares; las composiciones pueden afectar la forma de material activo (o sea el material antibiótico) mezclado con diluentes sólidos y/o coadyuvantes formadores de tabletas tales como almidón de maíz, lactosa, talco, ácido estearico, esterato de magnesio, gomas y sus similares. Se puede utilizar cualquiera de los materiales empleados en la práctica farmacéutica para formar cápsulas o comprimidos, a menos que haya incompatibilidad con el antibiótico.

10 Los materiales pueden elaborarse en comprimidos con o sin coadyuvantes (incipientes). Alternativamente el antibiótico puede colocarse en la cápsula común, o material capaz de ser resorbido, tal como la cápsula común de gelatina, para ser administrado en esta forma. Según otra realización más, el antibiótico puede envasarse en forma pulverulenta, para emplearse así. El antibiótico 66-A incluso sus sales metálicas y derivados, puede prepararse bajo la forma de una suspensión ingerible, en un aceite fijo apropiado, que contenga aproximadamente 2% de monoesterato de aluminio, en calidad de agente suspensor. Esta suspensión puede

15 administrarse por vía bucal o puede colocarse en cápsulas. El antibiótico en forma de unturas incluye una base de grasa del tipo petrolato, cremas, emulsiones, de agua en aceite y lociones, siendo las unturas útiles como tópicos. La terapia tópica se efectúa en forma de gotas nasales, nebulizaciones, rocíos y supositorios.

20

25



22 93 1 8

5 Para su uso veterinario, el preparado es esencialmente útil en la forma de mechas o supositorios, unturas, suspensiones aceito sas y sus similares. El antibiótico obtenido según la presente invención es particularmente útil cuando se administra por vía bucal o intramuscular. Una dosis practicable para el organismo humano es aproximadamente 50 hasta aproximadamente 1.000 mili-gramos por dosis mientras que un preparado pediátrico es tan ba-jo como aproximadamente 25 miligramos por dosis. Las dosis se administrarán aproximadamente una a seis veces por día según la edad y condición del paciente, la infección, la vía de adminis-10 tración, etc.

15 El porcentaje del ingrediente activo en estas com posiciones puede variar. Es necesario que el agente activo cong tituya una proporción tal que se obtenga una dosificación ade-cuada. Evidentemente, se podrán administrar diversas formas do-sificadas aproximadamente al mismo tiempo, aunque se ha encon-trado que particularmente en inyecciones intravenosas un porcen-taje de menos de aproximadamente 0,10 % del antibiótico tiene efecto, es preferible utilizar no menos de 10 % del mismo. La 20 eficacia del antibiótico aumenta con la cantidad administrada del antibiótico. Comprimidos que contienen desde unos 50 hasta unos 1.000 mg. del antibiótico 66-A o de sus derivados son úti-les. El portador farmacéutico sólido puede tener la forma de una cápsula de gelatina.

25 En virtud de su marcada actividad contra bacteria y su baja toxicidad, el antibiótico 66-A y sus derivados son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de varias enfermeda-des. Así que, ya sea por si sólo, o bien en combinación con com



229318

puestos sulfa tales como sulfadiazina, sulfa merazina, sulfa me
tazina (a razón de aproximadamente una parte del antibiótico por
2 partes del total de sulfa), y sus similares, o con otros anti
bióticos tales como tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraci
5 clina o sus similares, el antibiótico es útil en el tratamiento
de infecciones pulmonares y respiratorias de estafilococos, es
treptococos y neumococos. El modo de administración puede ser
por vía topical, bucal o parenteral. El antibiótico es igualmen
te útil en combinación con varias vitaminas tales como tiamina,
10 riboflavina, ácido ascórbico, niacinamida, piridorina, ácido pan
toténico o sales de pantotenato, vitamina B₁₂, ácido fólico y sus
similares. Se pueden combinar también otros materiales terapéu
ticamente útiles con el antibiótico. El antibiótico 66-A y sus
derivados son también útiles en el tratamiento de pioderma, fa
15 ringitis, peritonitis, otitis, rinitis y sus similares; y en com
binación con corticoides, su actividad terapéutica es fomentada
en el tratamiento de dermatitis atópica o de contacto, neuro
dermatitis, pouritis y sus similares. Los corticoides útiles in
cluyen cortisona, hidrocortisona y sus ésteres; Δ^1 -cortisona y
20 Δ^1 -hidrocortisona incluso otros compuestos esterificados en la
posición 21, vale decir acetato, ciclopentil propionato y sus si
milares; la 2-metil cortisona y 2-metil hidrocortisona, incluso
sus ésteres y sus similares. Al administrarse por ejemplo, por
vía parenteral, el antibiótico es también útil en el tratamien
25 to de una infección ocasionada en animales por Pasteurella mul
tocida o sea el microorganismo responsable de septicemia con he
morragia, que es una infección febril que afecta frecuentemente
al ganado durante su transporte al matadero. En virtud de su



229318

5 elevada actividad contra Nocardia asteroides, que es el organismo que motiva la actinomicosis en animales y en el hombre, el uso del antibiótico 66-A y sus derivados contra esta infección está igualmente indicado; el material antibiótico puede utilizarse también como suplemento de alimentos para animales, para fomentar el crecimiento de animales y aves, ya sea por sí sólo, o bien en combinación con otros antibióticos.

10 Los siguientes Ejemplos ilustran la producción, recuperación, concentración, purificación e indentificación del antibiótico 66-A y sus derivados. Estos Ejemplos son de naturaleza meramente ilustrativa, no debiéndose interpretar los mismos en el sentido de que el invento se limite a los detalles en ellos expuestos.

15 Ejemplo 1

A un frasco Erlenmeyer de 500 mililitros, se agregaron los siguientes materiales:

monohidrato de glucosa	2,5 gramos
torta de semilla de algodón	4,0 "
agua de canilla	hasta 100 mililitros

20 Se esterilizó el frasco calentándolo a 120°C. durante veinte minutos en una autoclave a vapor mantenida a una presión de 7,5 kilogramos. Una vez enfriado, se inoculó el medio con una suspensión acuosa de esporos de S.niveus NRRL 2466 obtenidos de un medio de cultivo inclinado de maltosa-triptona-agar (composición del medio de cultivo inclinado en gramos por litro: maltosa, 10; triptona, 5; K₂HPO₄, 0,5; FeSO₄, 7H₂O 01; agar, 15),
25 incubándose el frasco que contenía el medio, sobre un agitador rotativo Gump (250 rpm. con golpe de 5 cm) a 28°C, durante un lap -



1956

229318

so de tres días. Se utilizó 0,2 mililitro de esta semilla vegetativa para inocular un frasco Erlenmeyer de 500 mililitros que contenía el siguiente medio:

5 monohidrato de glucosa 2,8 gramos
 solubles de destilería 2,0 "
 agua hasta un volumen de 100 mililitros
 hidróxido sódico para ajustar
 el pH a 7,8 a 8,0.

10 Antes de efectuar el sembrado, se esterilizó el frasco calentándolo a 120° C durante 20 minutos, en un autoclave de vapor mantenido a una presión de 7,5 kilogramos. El pH del medio después de la esterilización será entre 6,2 y 7,5. El medio de fermentación en el frasco enfriado fué incubado en un agitador rotativo Gump (250 rpm. con un golpe de 5 cm.) a 28°C. Se probó la potencia del medio a los 3, 4 y 5 días. Durante el transcurso del crecimiento, bajó el PH según se determinó, desde un valor inicial de 6,5 a aproximadamente 6,0 después de lo cual el pH aumentó constantemente hasta 8,0 a 8,5. Después de 5 a 6 días la producción máxima bajo estas condiciones fué de aproximadamente 400 mcgs./ml.

15

20

25 El poder antibiótico fué determinado mediante el método standard de prueba de difusión por plato, midiendo la zona de inhibición contra el K. pneumoniae alrededor de una almadilla filtradora sumergida en la solución a probar y colocada sobre la superficie del medio de agar inoculado con el organismo de prueba.



22 93 1 8

Ejemplo 2

A un frasco Erlenmeyer de 500 mililitros, se agregaron 100 mililitros del siguiente medio estéril

	monohidrato de glucosa	10 gramos
5	cloruro de sodio	5 gramos
	peptona Difco	5 gramos
Medio A.	extracto de carne vacuna	10 gramos
	agua de canilla, hasta	1 litro

10 Previa inoculación con una suspensión acuosa de esporos de *S. niveus*, se incubó el frasco con dicho medio sobre un agitador de vaivén a 28°C, durante 72 horas. El crecimiento resultante fué la presemilla.

15 Se inoculó con 25 mililitros de la presemilla así obtenida un frasco fermentador de acero inoxidable, de 25 litros que contenía 12 litros del siguiente medio estéril

	azúcar quemado	10 gramos
	glicerol	5 "
	lactosa	5 "
	dextrina	5 "
20	solubles de destilería	7 "
Medio B	cloruro de sodio	5 "
	levadura de cervecería	2 "
	nitrate de amonio	2 "
	líquido de maceración de maíz	2 "
25	carbonato de calcio	4 "
	agua de canilla, hasta	1 litro

Se incubó el cultivo durante dos días a 28°C. El crecimiento re-



229318

5 sultante constituyó la semilla. Se inoculó con 12 litros de la semilla así obtenida un tanque de fermentación de acero revestido con resina, de 100 galones, que contenía 240 litros del medio B estéril. Se mantuvo el medio de fermentación a 28°C bajo agitación (280 rpm. agitación tipo tubo de tiraje) y se aeró con aire a 5700 litros por hora standard. Para fiscalizar la formación de espuma, se agregaron 300 mililitros de aceite de grasa al medio inicialmente y durante el transcurso de la fermentación, se agregaron 800 mililitros de una solución al 1% de octadedanol en aceite de grasa. Se cosechó el caldo después de 91 horas.

10 Una porción sin fracciones de 250 mililitros, del caldo que contenía 300 mcgs./ml. del antibiótico, fué ajustada a un pH de 8,0 mediante el aditamento de 140 mililitros de hidróxido sódico al 50%. La mezcla fué filtrada, utilizando 12 gramos de dicalita. Al filtrado de le agregó ácido sulfúrico al 12-N hasta que se obtuvo un pH constante de 2,0. Se separó el precipitado resultante y se volvió a disolver el mismo en agua, ajustando el pH de la solución en 9,0 con hidróxido sódico. Luego se sometió la solución a secamiento por congelación. Así se obtuvieron 117 miligramos de la sal sódica del antibiótico 66-A con un análisis de 500 mcg./ml. (análisis biológico de K. pneumoniae).

Ejemplo 3

25 A un frasco Erlenmeyer de 500 mililitros, se agregaron 100 mililitros del siguiente medio estéril

- | | |
|------------------------|-----------|
| monohidrato de glucosa | 10 gramos |
| cloruro de sodio | 5 " |



229318

peptona Difco	5 gramos
extracto de carne vacuna	10 "
agua de canilla, hasta	1 litro

5 Previa inoculación con una suspensión acuosa de esporos de *S. niveus* (obtenidos de un cultivo inclinado común de maltosa-triptona-agar), se incubó el frasco que contenía el medio sobre un agitador de vaivén, a 28°C durante 72 horas. El crecimiento resultante era la pre-semilla.

10 Se inocularon con 25 mililitros de esta pre-semilla en un frasco de fermentación de semillas de acero inoxidable de 25 litros, 12 litros del siguiente medio estéril

monohidrato de glucosa	25 gramos
torta de semilla de algodón, extraída	40 "
agua de canilla, hasta	1 litro

15 Se incubó el cultivo durante dos días a 28°C acompañado por aeración y agitación (aeración seis litros por minuto). El crecimiento resultante sirvió de semilla.

20 Se inocularon con 12 litros de esta semilla, en un fermentador de 100 galones, de acero revestido con resina, 250 litros del siguiente medio de fermentación estéril

monohidrato de glucosa	14 gramos
almidón	12,5 "
solubles de destilería	20 "
agua de canilla, hasta	1 litro

25 Se mantuvo el medio de fermentación a una temperatura de 28°C acompañado de agitación a un régimen de 280 rpm. con agitación



229318

de tipo tubo de tiraje, y de aeración con aire a un régimen estándar de 5700 litros por hora. Para fiscalizar la formación de espuma, se le agregaron 300 mililitros de aceite de grasa al medio inicialmente y 600 mililitros de una solución al 1% de octadecanol en aceite de grasa durante el curso de la fermentación. Se cosechó el caldo después de 114 horas.

Una porción de 225 litros del caldo se ajustó a un pH de 8,1 mediante el aditamento de 140 mililitros de hidróxido sódico al 50%. Se filtró la mezcla, utilizando diez kilogramos de Dicalita (un filtro de sílice diatomacea). Se ajustó el pH del caldo clarificado en 6,0 agregando 30 mililitros de ácido sulfúrico concentrado y a continuación se efectuó la extracción con 70 litros de acetato de amilo. Se extrajo la solución de acetato de amilo, que contenía el principio activo del antibiótico, con 18 litros de una solución al 10% de carbonato de sodio en agua, a un pH de 10,2. Se acidificó la solución de bicarbonato sódico a un pH de 6,0 mediante el agregado de 90 mililitros de ácido sulfúrico concentrado, efectuándose la extracción con cuatro litros de acetato de amilo. El extracto que contenía el principio activo del antibiótico fué concentrado por destilación a 325 mililitros que contenía 33,8 gramos de materia sólida. A una fracción de 50 mililitros de este concentrado, se le agregó 80 mililitros de acetona y 140 mililitros de Skellysolve B; se revolvió la solución durante 16 horas, filtrándose la misma luego. Se obtuvieron 2,0 gramos (rendimiento de 40%) del antibiótico 66-A cristalino sustancialmente puro, que corresponde a 1000 mcgs./ml. (análisis biológico con *K. pneumoniae*) y que funde entre 174 y 178°C.



229318

Ejemplo 4

A cada uno de una serie de seis francos Erlenmeyer de 500 mililitros, se agregaron 100 mililitros del siguiente medio estéril:

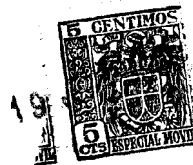
5	monohidrato de glucosa	10 gramos
	cloruro de sodio	5 gramos
	peptona Difco	5 gramos
	extracto de carne vacuna	10 gramos
	agua de canilla, hasta	1 litro

10 Se incubaron los frascos sobre un agitador de vaivén a una temperatura de 28°C durante 72 horas. El crecimiento resultante sirvió de pre-semilla.

15 Se inoculó con 600 mililitros de la pre-semilla así obtenida en un tanque de semilla, de acero revestido con resina, de 240 galones, una cantidad de 300 litros del siguiente medio estéril

	monohidrato de glucosa	25 gramos
	torta de semilla de algodón extraída	40 "
20	agua de canilla, hasta	1 litro

25 Se mantuvo el medio de fermentación a una temperatura de 28°C durante 48 horas, acompañado de aeración con 240 litros de aire por minuto y agitación con un impulsor de turbina de aspas curvadas a 200 revoluciones por minuto. Para controlar la formación de espuma, se agregaron inicialmente 300 mililitros de aceite de grasa y durante la fermentación 1100 mililitros de una solución al 1% de octadecanol en aceite de grasa. El crecimiento resultan



229518

te sirvió de semilla.

Se inocularon 5000 litros del siguiente medio de fermentación estéril

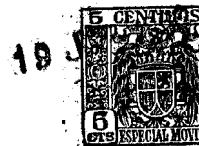
	monohidrato de glucosa	14 gramos
5	almidón	12,5 "
	residuos insolubles de destilería	20 "
	hidróxido sódico en cantidad su - ficiente para ajustar el pH en 8,0	
	agua de canilla, hasta	1 litro

10 en un tanque de acero inoxidable de 2000 galones con 300 litros de la semilla mencionada. Se mantuvo el medio a una temperatura de 28°C acompañado de aeración con 2400 litros de aire por minuto y agitación a 166 rpm. con dos impulsores de turbina de aspas curvadas. Para controlar la formación de espuma, se agregaron ini-

15 cialmente 5 litros de aceite de grasa, y luego 12 litros de una solución al 1% del octadecanol en aceite de grasa. Después de 115 horas se cosechó el caldo.

20 Se ajustó el pH de una fracción de 225 litros del caldo en 8,1 mediante el agregado de 140 mililitros de una solución de hidróxido sódico al 50%. La mezcla fué filtrada utilizando 10 kg. de Dicalita. Se ajustó el pH del caldo clarificado en 6,0 agregando 30 mililitros de ácido sulfúrico concentrado, después de lo cual se efectuó la extracción con 70 litros de acetato de amilo; una fracción de 100 mililitros del concentrado de

25 acetato de amilo, que contenía el principio activo del antibiótico, fué tratada con 600 mililitros de Skellysolve B, separándose por filtración el precipitado resultante. El material sólido volvió a disolverse en una mezcla de 400 mililitros de acetona y



229510

350 mililitros de agua, después de lo cual se añadieron 25 mililitros de ácido clorhídrico al 1 N, y 100 mililitros de agua. El material cristalino resultante fué recuperado por filtración. De este modo se obtiene el antibiótico 66-A en forma sustancialmente pura, dando (con análisis biológico *K. pneumoniae*) 1000 mg/ml, que funde entre 149 y 151°C.

Ejemplo 5

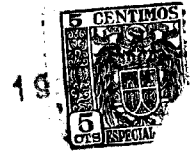
A 10 gramos del antibiótico cristalino 66-A en 300 mililitros de agua se añadieron 32 mililitros (dos equivalentes) de hidróxido sódico al 1N. La solución fué filtrada y secada por congelación, para dar 11 gramos de un sólido amorfo blanco o sea la sal disódica del antibiótico 66-A, según análisis (análisis biológico *K. pneumoniae*) 960 mcgs/ml. El material sólido es soluble en agua.

Ejemplo 6

A 1 gramo del antibiótico cristalino 66-A disuelto en 20 mililitros de acetato de amilo, se agregó 0,162 gramos (un equivalente) de di-n-propilamina. El precipitado amorfo blanco resultante o sea la sal di-n-propilamínica del antibiótico 66-A (1,1 gramo) fué separada y secada.

Análisis: calculado para $C_{36}H_{53}O_{12}N_3$: N, 5,99;
comprobado N, 5,72.

El espectro característico de absorción infrarroja (suspensión de aceite mineral) de la sal di-n-propilamínica del antibiótico 66-A exhibe bandas de absorción (expresadas en centímetros recíprocos) en las siguientes frecuencias: 3370, 3190, 1709, 1633, 1602, 1527, 1494, 1335, 1275, 1215, 1137, 1119, 1090,



22 95 18

1022, 995, 971, 952, 818, 774, 762, 744 y 719.

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 6, pero reemplazando la di-n-propilamina por 0,162 gramos de trietilamina, se obtiene la sal trietilamínica del antibiótico 66-A.

5



229.318

N O T A

Este registro consta de las siguientes reivindicaciones:

- 5 1.- Un procedimiento para la producción de antibióticos, caracterizado porque comprende cultivar un microorganismo productor del antibiótico 66-A, en un medio nutritivo sintético, bajo condiciones de inmersión aeróbicas, hasta que se impartiera a dicho medio actividad antibiótica sustancial.
- 10 2.- Un procedimiento, caracterizado porque comprende cultivar un microorganismo productor del antibiótico 66-A en un medio nutritivo sintético bajo condiciones de inmersión aeróbicas, hasta que se impartiera una sustancial actividad antibiótica a dicho medio y recuperar luego del mismo la actividad antibiótica.
- 15 3.- Un procedimiento, caracterizado porque comprende cultivar *Streptomyces niveus*, bajo condiciones aeróbicas de inmersión en un medio nutritivo sintético, que contiene un hidrato de carbono asimilable y un compuesto de nitrógeno orgánico, hasta que se impartiera una actividad antibiótica sustancial a dicho medio, y recuperar de éste luego la actividad antibiótica.
- 20 4.- Un procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado porque se mantiene el medio nutritivo a una temperatura entre aproximadamente 24° y aproximadamente 32°C, durante un periodo entre aproximadamente dos y aproximadamente seis días.
- 25 5.- Un procedimiento para recuperar la actividad antibiótica de un medio nutritivo fermentado de un microorganism-



229318

mo productor del antibiótico 66-A, caracterizado porque comprende extraer dicho medio nutritivo con un solvente orgánico inmiscible con agua y aislar luego dicha actividad antibiótica de la miscela de solvente y extracto.

5 6.- Un procedimiento para recuperar la actividad antibiótica de un medio nutritivo fermentado de un microorganismo productor del antibiótico 66-A, caracterizado porque comprende extraer dicho medio con un solvente orgánico inmiscible con agua, concentrar la miscela de solvente y extracto y precipitar
10 luego la actividad antibiótica mediante el aditamento de un solvente miscible, en el cual el antibiótico es ligeramente soluble.

15 7.- Un procedimiento para recuperar la actividad antibiótica de un medio nutritivo fermentado de un microorganismo productor del antibiótico 66-A, caracterizado porque comprende extraer dicho medio con un solvente orgánico inmiscible con agua, elegido del grupo que consiste de un alcohol inferior, acetato de alcohol inferior y cetona de alcohol inferior, y aislar luego dicha actividad de dicha miscela de solvente y extracto.

20 8.- Un procedimiento para recuperar la actividad antibiótica de un medio nutritivo fermentado de un microorganismo productor del antibiótico 66-A, caracterizado porque comprende extraer dicho medio con acetato de amilo y aislar luego dicha actividad de dicho extracto en acetato de amilo.

25 9.- Un procedimiento para recuperar la actividad antibiótica de un medio nutritivo fermentado de un microorganismo productor del antibiótico 66-A, caracterizado porque comprende extraer dicho medio con acetato de etilo y aislar luego dicha



22 93 18

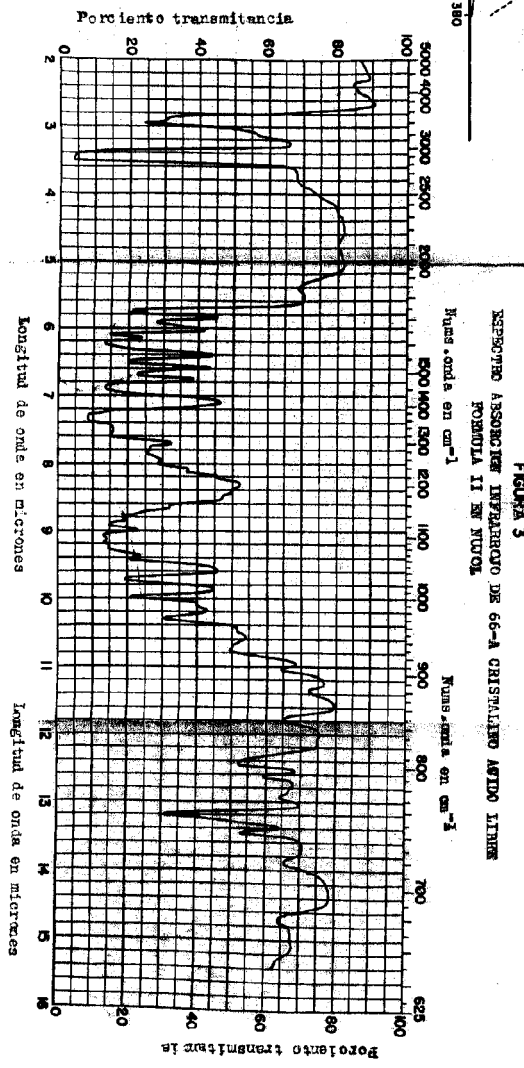
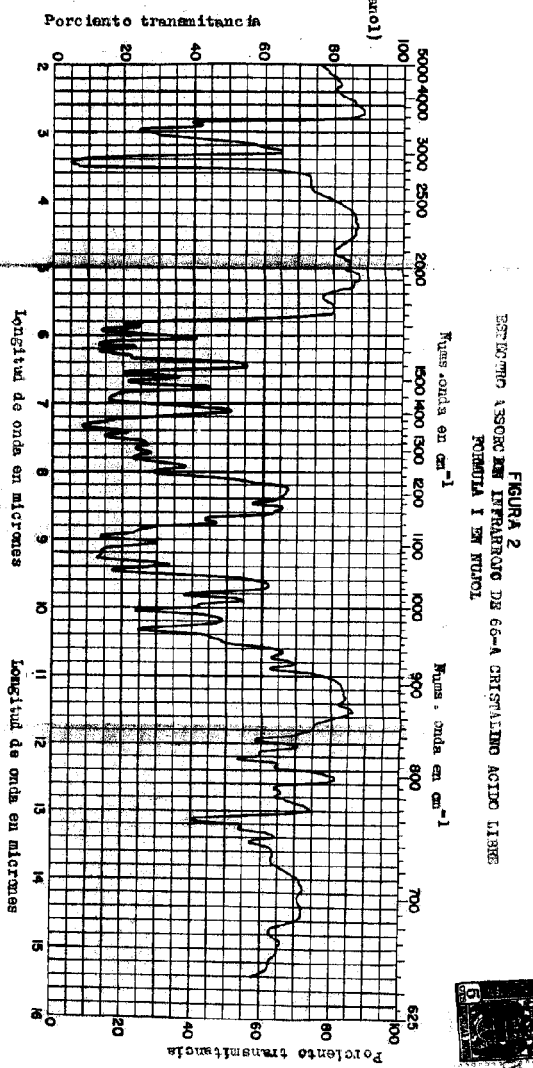
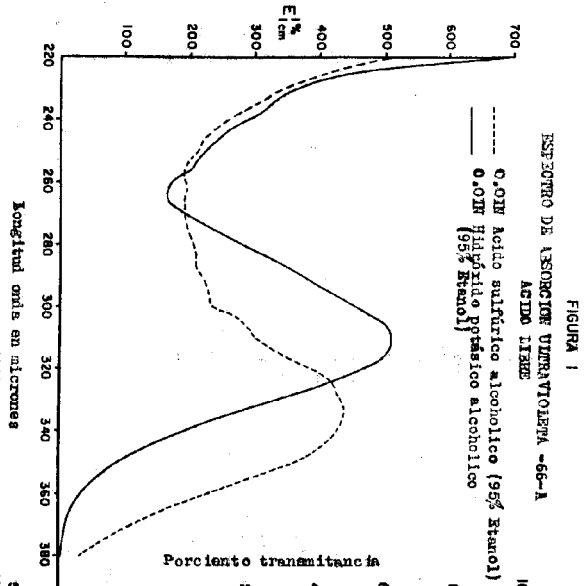
actividad de dicho extracto en acetato de etilo.

10.- Procedimiento para la producción de antibióti-
cos.

5 Según se describe y reivindica en la presente memo-
ria descriptiva.

Consta esta memoria de treinta y ocho hojas folia-
das y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 19 JUN. 1956



Handwritten signature

