

PATENTE DE INTRODUCCION - 8



Te. A. 2524-Sp.

231502

MEMORIA DESCRIPTIVA

sobre:

"Procedimiento de obtención de actinomicinas".

=====

SOLICITANTES: FARBENFABRIKEN BAYER Aktiengesellschaft, entidad alemana,
domiciliada en Leverkusen Bayerwerk, Alemania.

=====

- Como actinomicinas, se conocen unos productos de metabolismo, antibióticamente eficaces, cristalinos y rojos de determinados estreptomices. Según las investigaciones de Waksman, el "streptomices antibioticus" suministra una actinomicina A, Todd y sus colaboradores han aislado una actinomicina de cultivos de otra clase de estreptomices, que han denominado actinomicina B, Brockmann y sus colaboradores han descubierto como producto del metabolismo de estreptomices chrysomallus
5. otra actinomicina que, primero denominaron actinocrycina y,
- 10.



más adelante actinomicina C (Patente alemana nº 912.010).
Brockmann ha aislado otras actinomicinas de otros
cultivos de "streptomyces" que han denominado actinomicina
I y actinomicina X y que posiblemente se asemejan a la
5. actinomicina A ó B, respectivamente.

Aunque estas actinomicinas se comportan con
relación a los métodos de disociación clásicos como
materias unitarias, ha demostrado el análisis de
distribución, que todas ellas se componen de diferentes
10. componentes.

Hoy día se conocen una serie completa de
componentes individuales de las distintas actinomicinas
que se diferencian entre sí por cifras índice. Así, se
compone por ejemplo la actinomicina C esencialmente de
15. los componentes C_1 , C_2 y C_3 y, también la actinomicina A y
la B contienen, además de los componentes principales,
algunos componentes secundarios. A pesar de las múlti-
ples posibilidades de combinación teóricas existentes
se ha demostrado siempre hasta ahora que la composición
20. de las diferentes actinomicinas, con respecto a sus
componentes, es ámpliamente característica. Las actino-
micinas A y B se componen, al igual que las actinomicinas
I y X, esencialmente de un componente principal y al
mismo tiempo de determinados componentes secundarios
25. característicos, mientras que la la actinomicina C de
dos componentes principales C_2 y C_3 , un componente
secundario C_1 y además de pequenísimas cantidades de
otras actinomicinas.

La composición de las diferentes actinomicinas, / depende
30. esencialmente de la clase del estreptomices que se utiliza



para su obtención. Los múltiples cultivos que se han investigado hasta la fecha se pueden subdividir claramente en tres grupos, en aquellos que producen A ó I, en aquellos que forman B ó X , y , finalmente los formadores de C.

- 5.
- La influencia de la solución del caldo solamente tenía , con respecto a la composición de las actinomicinas una importancia secundaria. Según los ensayos hasta ahora efectuados no se había logrado conseguir mediante cambios en el agente del caldo desplazamientos esenciales de los componentes normales y mucho menos la formación de nuevos componentes que normalmente no hubieran estado ya contenidos en la mezcla. Según N.Pfennig, Arch. f.Mikrobiol.18. Pág.327, 1953 se puede deducir de todo esto que el número de actinomicinas diferentes existentes en la naturaleza con sus componentes no es arbitrario ,sino que solamente se encuentran algunos tipos muy determinados.
- 10.
- 15.

- Se ha descubierto ahora que se puede guiar la clase de los componentes durante la obtención de actinomicinas mediante el cultivo de cepas de hongos del grupo de los estreptomices que pueden formar actinomicinas si, a los agentes de nutrición utilizados para el cultivo, se agregan algunos ácidos amínicos con más de 2 átomos de C o tales compuestos que, durante las condiciones del cultivo se transformen en tales ácidos amínicos. No es improbable que estos ácidos amínicos se incorporen en la molécula de actinomicina, que, a nuestro saber actual, se compone de un cromoforo y una cadena lateral peptídica y de que la composición de dicha cadena peptídica se
- 20.
- 25.
- 30.



modifique cuando en el caldo de nutrición se encuentran algunos ácidos amínicos en evidente exceso.

- Ya se han cultivado formadores de actinomicina en caldos ácido aminosos. Así, se han agregado, por ejemplo materias proteínicas, tales como harina de soja y jugo de levadura hervida, y asimismo se ha utilizado ya glicocol como fuente de nitrógeno. Con todos estos aditivos, que se agregaron con miras a mejorar el crecimiento de las cepas de estreptomices, no se inició ningun desplazamiento en la composición de los diferentes componentes. Es, por lo tanto, sorprendente que, por ejemplo, con la adición de Valina al caldo de un formador de actinomicina C se consiga reprimir ámpliamente la formación del componente principal C₃ a favor de la formación de C₁ y hacer de esta manera de un componente secundario, un componente principal. Mas sorprendente es aún el hecho de que hasta se pueden obtener biosintéticamente actinomicinas nuevas hasta ahora no conocidas, como sucede, por ejemplo, al agregar isoleucina al caldo de un formador de actinomicina I.

- Además de la actinomicina I que generalmente se forma como componente principal se obtienen una serie de actinomicinas nuevas y típicas que cuantitativamente forman con relación a la actinomicina I la mayor parte. El nuevo procedimiento dá, por lo tanto, la posibilidad de poder obtener a opción los componentes especialmente deseados como componentes principales, o tambien la obtención de nuevas actinomicinas hasta ahora desconocidas que pudieran ser más ventajosas que las hasta ahora conocidas.



- Como ácidos amínicos que, de acuerdo con la presente invención se agregan al caldo, no solamente entran en consideración aquellos que normalmente existan en las cadenas laterales peptídicas de las actinomicinas, por ejemplo, valina, isoleucina, treonina, prolina, sarcosina y N-metilovalina, sino también aquellos que hasta ahora no se encontraron como componentes de las actinomicinas, por ejemplo leucina, serina, arginina, N-metiloanilina, así como todos los demás ácidos amínicos que en formas L son normalmente componentes de las cadenas peptídicas.
5. Por lo general es suficiente agregar un solo ácido amínico, pero también agregando dos o varios ácidos amínicos se encuentran efectos especiales en la composición de las actinomicinas obtenidas. Lo esencial es, que, mediante
10. estos aditivos se forme un exceso unilateral de ácidos amínicos individuales en el caldo y que, los estreptomices, de esta manera, no dispongan, como al agregar materias albuminosas, de todos los componentes albuminosos en forma idéntica, para selección arbitraria.
15. En lugar de los mismos ácidos amínicos se le pueden agregar al caldo también aquellos compuestos que bajo las condiciones del cultivo se transformen en ácidos amínicos, por ejemplo, los ácidos cetónicos y ácidos oxi correspondientes a los ácidos amínicos, o
20. los derivados de los ácidos amínicos, como por ejemplo sus ésteres, amidas o sales o los alcoholes correspondientes a los ácidos amínicos.
25. También con oligopéptidas se puede desviar la formación de las actinomicinas hacia una dirección determinada. Posiblemente se coloca el oligopeptida como
- 30.



tal en la cadena peptídica sin que primero sea esta disociada.

- El grado de la desviación depende de la concentración de las materias agregadas. Con aditivos
5. en baja concentración generalmente no se nota influencia alguna, pero por el contrario ya está bien pronunciada con concentraciones de 0,3% y muy considerable si la concentración de los ácidos amínicos en el caldo se aumenta a 0,5% y más. Por ello es conveniente agregar
10. los diferentes ácidos amínicos en una concentración de 0,3 a 1 % ,pero, según la accesibilidad y precio del ácido amínico en cuestión, se podrían preferir otras concentraciones.

- Por lo general se forman también al añadir
15. varios ácidos amínicos mezclas de varias actinomicinas. La composición cualitativa y cuantitativa de estas mezclas depende de la clase del ácido amínico agregado, de su concentración y de la clase de la cepa del actinomiceta utilizado. Las mezclas se pueden obtener en forma en sí
20. conocida, por ejemplo, por extracción con acetato butílico o etílico del caldo y su composición ser reconocida por ejemplo mediante cromatografía de distribución anular sobre papel. Estas se pueden separar con ayuda de la cromatografía de distribución, por ejemplo,
25. por el procedimiento de la patente alemana nº 930.579 y disociar en componentes individuales puros.

Las actinomicinas así obtenidas, se pueden utilizar como medicamentos.

EJEMPLO 1 -

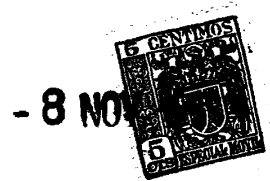
30. Un caldo de la siguiente composición:



- 1,0 l. de agua del grifo.
- 20,0 g. de glicerina
- 5,0 g. de nitrato potásico.
- 5,8 g. de D,L-valina
- 5. 1,0 g. de fosfato potásico.
- 2,0 g. de cloruro de sodio
- 1,0 g. de carbonato de calcio
- 100,0 mg. de carbonato de magnesio.
- 10,0 mg. de sulfato de hierro (II)
- 10. (pH = 6,8 a 7,2)

- se inyecta con la cepa de estreptomicinas BoP 476 y se agita en el matraz durante 5 días a 30°. La solución del cultivo con un valor pH final de 8,4 y un contenido de 24 mg. de actinomicina por litro de caldo se agita tres veces con poco éster acético o acetato butílico y el extracto de color rojo claro se reduce bajo presión disminuida. El residuo lavado con poca ligroina caliente dá en la cromatografía de distribución anular con el sistema de dos fases de 1 parte en volumen de butanol, 4 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 5 partes en volumen de solución acuosa al 8% de sodio m-ácido creson-tínico, tres anillos que con los valores R_{c2} 0,62, 1 y 1,63 corresponden a las actinomicinas C_1 , C_2 y C_3 . La actinomicina C_1 aparece como componente principal, la actinomicina C_3 como componente secundario.
- 15.
 - 20.
 - 25.

El mismo resultado se obtiene con un caldo de la siguiente composición:



- 1,0 l. de agua del grifo.
- 20,0 g. de glicerina
- 6,6 g. de nitrato potásico
- 3,85 g. de D,L-valina
- 5. 1,0 g. de fosfato potásico sec.
- 2,0 g. de cloruro de sodio
- 500,0 mg. de carbonato de calcio
- 50,0 mg. de carbonato de magnesio
- 10,0 mg de sulfato de hierro (II)
- 10. (pH = 6,8 a 7,2)

El rendimiento, bajo las mismas condiciones de cultivo es de 23 mg. de actinomicina por litro de solución de cultivo, el valor pH final después de 6 días de duración del cultivo de 8,4

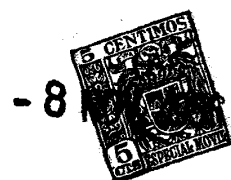
- 15. Contrariamente a esto, la cepa de estreptomices BoP 476 en solución de caldo sin vanilina, por ejemplo, de la composición:

- 1 l. de agua del grifo
- 20 g. de glicerina
- 20. 10 g. de nitrato potásico
- 1 g. de fosfato potásico sec.
- 2 g de cloruro de sodio
- 50 mg. de sulfato de magnesio
- 10 mg de sulfato de hierro (II)

- 25. (pH = 6,8 a 7,2)
- forma una mezcla de actinomicina en la que la actinomicina C₃ y C₂ aparecen como componentes principales, actinomicina C₁ como componente secundario.

EJEMPLO 2 -

- 30. Un caldo de la composición:



- 5. 1,0 l. de agua del grifo
20,0 g de glicerina
5,0 g de nitrato potásico
6,5 g de D,L-isoleucina
1,0 g de fosfato potásico sec.
2,0 g de cloruro de sodio
1,0 g de carbonato de calcio
100 mg de carbonato de magnesio
10,0 mg de sulfato de hierro (II)
- 10. (pH = 6,8 a 7,2)

se inyecta con cepa del estreptomices BoP 509. El cultivo efectuado en el matraz se agita durante 5 días a 30° y se elabora como se ha descrito en el ejemplo 1. El rendimiento es de 57 mg. de actinomicina por litro de cultivo, el pH final de 8,3. Según la investigación en el cromatograma de distribución anular con el sistema, 1 parte en volumen de butanol, 4 partes en volumen de di-n-éter butílico, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% del sodio m-ácido cresotínico

- 15. se compone la mezcla de actinomicina aislada de partes aproximadamente iguales de cinco componentes con los valores R_{c2} de 0,62, 1, 1,63, 2,41 y 3,53.
- 20. Por el contrario, la cepa de estreptomices BoP 509 sobre caldos sin adición de isoleucina

- 25. compuestos por ejemplo de

- 30. 1,0 l. de agua del grifo
20,0 g de glicerina
5,0 g de soja triturada
2,5 g de glicocol
1,0 g de fosfato potásico sec.



- 1,0 g de cloruro de sodio
- 100,0 mg de sulfato de magnesio
- 100,0 mg de sulfato de hierro (II)
- 10,0 mg de carbonato de calcio

5. (pH = 6,8 a 7,2)

dá segun la cromatografía de distribución anular (sistema arriba mencionado) una mezcla actinomicínica de un componente principal con $R_{c2} = 0,62$ y un componente secundario con $R_{c2} = 1$.

10. Los valores R_{c2} son una medida para la situación de la zona correspondiente en el cromatograma de papel anular, referido a la zona del componente puro C. Se calcula dividiendo la longitud del camino del componente correspondiente por la longitud del camino del componente C.
- 15.

EJEMPLO 3 -

Un caldo de la composición

- 1,0 l. de agua del grifo
 - 20,0 g de glicerina
 - 20. 5,0 g de nitrato potásico
 - 6,5 g de D,L-isoleucina
 - 1,0 g de fosfato potásico sec.
 - 2,0 g de cloruro de sodio
 - 1,0 g de carbonato de calcio
 - 25. 100,0 mg de carbonato de magnesio
 - 10,0 mg de sulfato de hierro (II)
 - 1,0 g de aceite de tocino
- (pH = 6,8 a 7,2)

- se inyecta con la cepa del estreptomices BoP 476 y se agitan en un fermentador "submers" durante 5 días a 28°
- 30.



- ventilando bien. La solución del cultivo con un valor pH final de 8,9 se separa del micelio centrifugando una vez y se agita cinco veces con pequeñas partes de éster acético. El micelio centrifugado se extrae igualmente con
5. éster acético hasta que el extracto solamente esté ligeramente amarillo. De los extractos reunidos se separa el disolvente a presión reducida. El residuo rojo se lava dos veces con ligroina poco caliente. El rendimiento es de 200 mg. de actinomicina por litro de solución de
10. cultivo. Para la ulterior limpieza se disuelve la mezcla de actinomicina en benzol, se filtra y se absorbe en una columna de óxido de aluminio. El colorante rojo se eluye con benzol-éster acético (Proporción volumétrica 1:1) y se recristaliza de éster acético puro. La mezcla
15. de actinomicina así obtenida se compone según el cromatograma de distribución anular, efectuado con el sistema de dos fases, 1 parte en volumen de butano, 4 partes en volumen de di-n-éter butílico, 5 partes de una solución acuosa al 8% del sodio m-ácido cresotínico de
20. partes aproximadamente iguales de los tres componentes con los valores R_{c2} 1,6 , 2,4 y 3,5.
- Por el contrario, la cepa de estreptomices BoP 476 forma bajo condiciones de cultivo análogas sobre el mismo caldo, pero sin isoleucina, una mezcla de actinomicina que en el cromatograma de distribución anular
25. (sistema arriba mencionado) se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 1 y 1,6 y un componente secundario con $R_{c2} = 0,62$.
- Con un caldo de la composición:
30. 1,0 l. de agua del grifo



- 20,0 g de glicerina
- 7,0 g de nitrato potásico
- 1,5 g de D,L-isoleucina
- 1,0 g de fosfato potásico sec.
- 5. 2,0 g de cloruro de sodio
- 100,0 g de sulfato de magnesio
- 100,0 g de carbonato de magnesio
- 10,0 mg de sulfato de hierro (II)
- 500,0 mg de carbonato de calcio

10. (pH = 6,8 a 7,2)

se obtiene ,con la misma cepa, un rendimiento de 150 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo, una mezcla de actinomicina que con respecto a los componentes principales es idéntica a la arriba

15. descrita. Por el cromatograma de distribución anular, efectuado con el sistema de distribución 4 partes en

volumen de di-n-éter-butílico, 1 parte en volumen de butanol, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% de sodio m-ácido cresotínico, se vé que contiene además de los componentes principales, con los valores R 1,6, 2,4 , 3,7 otros dos componentes secundarios con los valores R ^{c2} 0,62 y 1.

20.

EJEMPLO 4 -

Un caldo de la composición:

25.

- 1,0 l. de agua del grifo
- 20,0 g de glicerina
- 5,0 g de nitrato potásico
- 6,5 g de D,L-leucina
- 1,0 g de fosfato potásico sec.
- 30. 2,0 g de cloruro de sodio



500,0 mg de carbonato de calcio
100,0 mg de carbonato de magnesio
10,0 mg de sulfato de hierro (II)
(ph = 6,8 a 7,2)

5. se inyecta con la cepa estreptomices BoP 476, se agita durante 6 dias en un fermentador a 28° ventilando bien y se elabora conforme se ha descrito en el ejemplo 3. El rendimiento es de 65 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo. La mezcla de actinomicina obtenida
10. se compone, según el cromatograma de distribución anular, efectuado con sistema de dos fases, de 1 parte en volumen de butanol, 4 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% del sodio m-ácido cresotínico, de 4 componentes con los valores R_{c2} 1, 1,6, 2,4, 3,5 y cuatro componentes secundarios con los valores R_{c2} 0,62, 1,2, 1,9 y 2,8.
15. Por el contrario, la cepa estreptomices BoP 476, en condiciones análogas pero sin la leucina, forma una mezcla de actinomicina que en el cromatograma de distribución anular (sistema arriba mencionado) se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 1, 1,6 y un componente secundario con el valor R_{c2} = 0,62.
- 20.

EJEMPLO 5 -

Un caldo de composición:

25. 1,0 l. de agua del grifo
20,0 g de glicerina
5,0 g de nitrato potásico
6,5 g de D,L-norleucina
1,0 g de fosfato potásico sec.
30. 1,5 g de cloruro de sodio



- 250,0 mg de carbonato de calcio
- 50,0 mg de sulfato de magnesio
- 50,0 mg de carbonato de magnesio
- 10,0 mg de sulfato de hierro (II)

5. 500,0 mg de levadura de pan (incubada antes de la esterilización del caldo durante 3 horas a 37°)

(pH = 6,8 a 7,2)

10. se inyecta con la cepa de estreptomicinas BoP 476 y se agita durante 6 días en el matraz a 30°. La solución de fermentación con un valor pH de 7 se separa del micelio centrifugando una vez y la solución de cultivo clara que se obtiene, así como el micelio, se extraen con éster acético o acetato butílico. De los extractos reunidos
15. se retira el disolvente bajo presión reducida, el residuo rojo se extrae hasta el agotamiento con benzol y se absorbe en una columna de óxido de aluminio. El eluado obtenido con benzol-éster acético (1:2) dá al reducir a un rendimiento de 36 mg por litro de solución de cultivo, una mezcla
20. de actinomicina que, según el cromatograma de distribución anular (sistema 1 parte en volumen de butanol, 4 partes en volumen de di-n-éter butílico, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% de sodio m-ácido cresotínico) se compone de tres componentes principales con los valores
25. R_{c2} 0,62 , 1 y 1,63. Los tres componentes corresponden a los componentes de la mezcla actinomicínica C_1 , C_2 y C_3 .

Por el contrario, la cepa BoP 476 bajo las mismas condiciones de experimento sin la norleucina, si bien dá también estos tres componentes, el componente con el valor R_{c2} 0,62 solamente aparece como ligero componente secundario. Por la adición de la norleucina se ha

30.

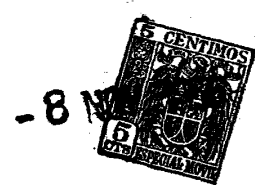


desplazado la proporción de los tres componentes a favor del componente con el valor R_{c2} 0,62.

EJEMPLO 6 -

Un caldo de la composición:

5. 1,0 l. de agua del grifo
20,0 g de glicerina
5,0 g de nitrato potásico
4,4 g de sarcosina
1,0 g de fosfato potásico sec.
 10. 1,5 g de cloruro de sodio
250,0 mg de carbonato de calcio
50,0 mg de carbonato de magnesio
50,0 mg de sulfato de magnesio
10,0 mg de sulfato de hierro (II)
 15. 2,0 g de levadura de pan (incubada antes de la esterilización del caldo durante 3 horas a 37°)
(pH = 6,8 a 7,2)
- se inyecta con la cepa de estreptomices BoP 509, se agita durante 6 días a 30° y se elabora como se ha descrito en el ejemplo 5. El valor pH final de la solución de cultivo es de 8,8 , el rendimiento 100 mg de actinomicina por l. de solución de cultivo. La mezcla de actinomicina obtenida se compone según el cromatograma de distribución anular efectuado con el sistema 5 partes en volumen de acetato amílico, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 10% de sodio-m-ácido cresotínico, de dos componentes principales con los valores R_{c2} 0,46 y 0,66 y un componente secundario con $R_{c2} = 0,40$.
20. 25. 30. Por el contrario, la cepa BoP 509 bajo condiciones de cultivo análogas pero sin sarcosina solamente da un componente principal con el valor R_{c2} 0,66 y un compo-



nente secundario con $R_{c2} = 1,0$.

EJEMPLO 7 -

Un caldo de la siguiente composición

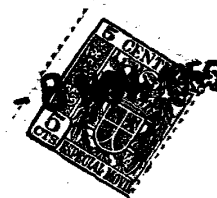
- 1 l. de agua del grifo
- 5. 20,0 g de glicerina
- 5,0 g de nitrato potásico
- 4,4 g de sarcosina
- 1,0 g de fosfato potásico sec.
- 2,0 g de cloruro de sodio
- 10. 500,0 mg de carbonato de calcio
- 100 mg de carbonato de magnesio
- 10,0 mg de sulfato de hierro (II)

se inyecta con la cepa estreptomices BoP 476, se agita durante 7 días en el matraz a 30° y se elabora como

- 15. descrito en el ejemplo 1. La mezcla de actinomicina obtenida en un rendimiento de 30 mg por litro se compone según el cromatograma de distribución anular con el sistema 1 parte en volumen de butanol, 4 partes en volumen de di-n-éter butílico, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% de sodio m-ácido cresotínico de partes iguales de cinco componentes principales con los valores R_{c2} 0,6, 0,8, 1, 1,3, 1,6 y un componente secundario con $R_{c2} = 0,45$. Por el contrario la cepa estreptomices BoP 476 sin sarcosina forma una mezcla
- 20. de actinomicina en la que los componentes con el valor R_{c2} 1 y 1,6 aparecen como componentes principales y los del valor R_{c2} 0,6 como componente secundario.
- 25.

EJEMPLO 8 -

Un caldo de la composición:



- 1,0 l. de agua del grifo
20,0 g de glicerina
4,5 g de nitrato potásico
9,0 g de N-N' -dimetildicetopiperacina
5. 1,0 g de fosfato potásico sec.
2,0 g de cloruro de sodio
50,0 mg de carbonato de magnesio
10,0 mg de sulfato de hierro (II)
500,0 mg carbonato de calcio
10. 500,0 mg de levadura de pan (incubada antes de la esterilización del caldo durante 3 horas a 37°).

(pH = 6,8 a 7,2)

15. se inyecta con la cepa de estreptomices BoP 509 se agita durante 6 días en el matraz a 30° y se elabora como en el ejemplo 5. El rendimiento es de 34 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo, el valor pH final de la solución de cultivo de 7,2. La mezcla de actinomicina obtenida se compone, según el cromatograma de distribución
20. anular con el sistema 5 partes en volumen de acetato amílico y 5 partes en volumen de una solución acuosa al 10% de sodio m-ácido cresotínico, de dos componentes principales con los valores R_{c2} 0,46 y 0,66. Por el contrario, la cepa de estreptomices BoP 509 sin el
25. N,N'-dimetilodicetopiperacina dá una mezcla actinomicínica con un componente principal que se encuentra en $R_{c2} = 0,66$ y un componente secundario en $R_{c2} = 1$.

EJEMPLO 9 -

Un caldo de la composición:



- 1,0 l. de agua del grifo
20,0 g de glicerina
5,0 g de nitrato potásico
7,9 g de leucinetiloesterclorohidrato
5. 1,0 g de fosfato potásico sec.
1,2 g de cloruro de sodio.
250,0 mg de sulfato de sodio
150,0 mg de carbonato de magnesio
10,0 mg de sulfato de hierro (II)
10. 1,0 g de carbonato de calcio
1,0 g de levadura (incubada antes de la esterilización del caldo durante 3 horas a 37°)
- se mezcla antes de esterilizar con 0,4 cm³ de n-sosa cáustica y a continuación se esteriliza durante 1 $\frac{1}{2}$ horas a 110°. El valor pH después de la esterilización es de 6,5. El caldo de alimentación se inyecta con una cepa de Bo. 476 y se agita durante un total de 5 días en el matraz a 30°. El valor pH baja dentro de los dos primeros a 5,3, pero después de 5 días de duración del cultivo alcanza el valor 7. La solución del cultivo se separa del micelio con la centrífuga y ambas fracciones se extraen hasta agotarse con éster acético. El rendimiento es de 90 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo. De los extractos reunidos se separa el disolvente bajo presión reducida, el residuo rojo se extrae hasta el agotamiento con benzol, se filtra y se absorbe en una columna de óxido de aluminio. El eluado obtenido con benzol-éster acético (1:2) contiene una mezcla de actinomicina que, según
- 20.
- 25.
30. el cromatograma de distribución anular efectuado con el



- sistema de distribución 6 partes en volumen de di-n-éter butílico, 1 parte en volumen de butanol y 7 partes en volumen de una solución acuosa al 6% de sodio-m-ácido cresotínico, se compone de cuatro componentes principales con el valor R_{c2} 1, 1,15, 1,6 y 2 así como de un componente secundario con $R_{c2} = 0,7$.
5. Por el contrario, la cepa de estreptomices BoP 476 sin leucinetiloester-clorhidrato, sin sulfato de sodio y con mayor cantidad de cloruro de sodio
10. forma una mezcla actinomicínica que , en el cromatograma de distribución anular con el sistema 6 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 1 parte en volumen de butanol, 7 partes en volumen de una solución acuosa 6% de sodio m-ácido cresotínico se compone de dos
15. componentes principales con los valores R_{c2}^1 y 1,6 y un componente secundario con $R_{c2} = 0,7$.

EJEMPLO 10 -

- Un caldo de la composición
- 1,0 l. de agua del grifo
20. 20,0 g de glicerina
- 5,0 g de nitrato potásico
- 6,5 g de D-L-leucina
- 1,0 g de fosfato potásico sec.
- 1,5 g de cloruro de sodio
25. 50,0 mg de sulfato de magnesio
- 50,0 mg de carbonato de magnesio
- 10,0 mg de sulfato de hierro (II)
- 250,0 mg de carbonato de calcio
- 2,0 mg de levadura de pan (incubada antes de la
30. esterilización del caldo durante 3 horas
- a 37°)
- (pH=6,8 a 7,2)



- se inyecta con una cepa de estreptomicinas BoP 509, se agita durante 8 días a 30° y se elabora como se ha descrito en el ejemplo 1. El pH final de la solución de cultivo es de 8,8 el rendimiento de 30 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo. Según la comprobación en el cromatograma de distribución anular con el sistema 4 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 1 parte en volumen de butano y 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% de un sodio m-ácido cresotínico
5. se compone la mezcla actinomicínica aislada de 3 componentes principales con los valores R_{c2} 0,62, 1 y 1,5 así como del componente secundario con el valor R_{c2} 2,2.
- 10.

- Por el contrario, la cepa BoP 509 sin adición de leucina forma una mezcla de actinomicina que en el mismo cromatograma de distribución anular se compone de un componente principal con el valor R_{c2} 0,62 y un componente secundario con $R_{c2} = 1$.
- 15.

EJEMPLO 11 -

20. Un caldo de la composición
- 1,0 l. de agua del grifo
 - 20,0 g de glicerina
 - 5,0 g de nitrato potásico
 - 7,3 g de D-L-lisinhidrocloruro
- 25.
- 1,0 g de fosfato potásico sec.
 - 2,0 g de cloruro de sodio
 - 50,0 mg de carbonato de magnesio
 - 10,0 mg de sulfato de hierro (II)
 - 10,0 mg de sulfato de magnesio
30. 500,0 mg de carbonato de calcio



1,0 g de levadura de pan (incubada antes de la esterilización del caldo durante 3 horas a 37°)

- se mezcla antes de la esterilización con 1 cm³ de sosa n-cáustica, se esteriliza durante 1 $\frac{1}{2}$ horas a 110° y se inyecta con la cepa BoP 476 y se agita durante 5 días a 30°. El valor pH final de la solución de cultivo es de 6,6 a 6,8; el rendimiento de 40 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo. La mezcla de actinomicina
- 5.
10. pura se obtiene como se ha descrito en el ejemplo 3 y se compone según el cromatograma de distribución anular efectuado con el sistema 4 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 1 parte en volumen de butanol, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% del sodio m-ácido cresotínico de dos componentes principales con los valores R_{c2} 1 y 1,6 así como de tres componentes secundarios con los valores R_{c2} 0,6 , 1,3 y 2.
- 15.

- Por el contrario, la cepa BoP 476 sin lisin
20. forma una mezcla de actinomicina de dos componentes principales R_{c2} 1 y 1,6 y un componente secundario con R_{c2} = 0,6 (igual sistema de distribución como arriba).

EJEMPLO 12 -

25. Un caldo de la composición
- 1,0 l. de agua del grifo
- 20,0 g de glicerina
- 4,0 g de nitrato potásico
- 9,3 g de D-L-leucilglicina
30. 1,0 g de fosfato potásico sec.



2,0 g de cloruro de sodio
100,0 mg de carbonato de magnesio
500,0 mg de carbonato de calcio
10,0 mg de sulfato de hierro (II)

5. 200,0 mg de levadura (incubada antes de la esterilización del caldo durante 3 horas a 37°)

(pH = 6,8 a 7,2)

10. se inyecta con la cepa de estreptomices BoP 476 y se agita en el matraz durante 7 días a 30°. La solución de cultivo con un pH final de 7,5 a 7,8 y con un rendimiento de 70 mg de actinomicina por litro se elabora como descrito en el ejemplo 5. La mezcla de actinomicina obtenida se compone, según el cromatograma de distribución anular con

15. el sistema 6 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 1 parte en volumen de metanol, 7 partes en volumen de una solución acuosa al 6% de un sodio m-ácido cresotínico de un componente secundario con el valor R_{c2} 0,7 y cuatro componentes principales con los valores R_{c2} 1, 1,25, 1,6 y 2.

20. Por el contrario, la cepa estreptomices BoP 476 sin la D,L-leucilglicina forma una mezcla de actinomicina que se compone de dos componentes principales con valores R_{c2} 1 y 1,6 y un componente secundario con el valor R_{c2} 0,7 (idéntico sistema de distribución como arriba descrito).
- 25.

EJEMPLO 13 -

Un caldo de la composición

1,0 l. de agua del grifo

30. 20 g de glicerina



- 5 g de nitrato potásico
6 g de D,L-treonina
1 g de fosfato potásico sec.
2 g de cloruro de sodio
5. 50 g de carbonato de magnesio
10 mg de sulfato de magnesio
10 mg de sulfato de hierro (II)
500 mg de carbonato de calcio
500 mg de levadura (incubada antes de la esterilización del caldo durante 3 horas a 37°)
10. (pH=6,8 a 7,2)

- se inyecta con la cepa de estreptomices BoP 476, se agita durante 7 días a 30° en el matraz y se elabora como descrito en el ejemplo 5. El pH final de la solución de cultivo es de 8,3, el rendimiento 70 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo. La mezcla de actinomicina obtenida se compone, según la determinación en el cromatograma de distribución anular efectuado con el sistema 4 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 1 parte en volumen de butanol, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% de un sodio m-ácido cresotínico, de un componente principal con el valor R_{c2} 1,6 y de dos componentes secundarios con los valores R_{c2} 1 y 2,35. El componente principal 1,6 corresponde a la actinomicina
15. C_3 . Por el contrario la cepa de estreptomices BoP 476 sin treonina forma una mezcla de actinomicina que, en el mismo sistema de distribución, se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 1 y 1,6 y un componente secundario con el valor R_{c2} 0,6.
20. 25.

30. EJEMPLO 14 -

Un caldo de la composición:



- 1,l. de agua del grifo
- 20 g. de glicerina
- 5 g de nitrato potásico
- 8 g de D,L-norvalina
- 1 g de fosfato potásico sec.
- 2 g de cloruro de sodio
- 150 mg de carbonato de calcio
- 50 mg de carbonato de magnesio
- 50 mg de sulfato de magnesio
- 25 mg de sulfato de sodio
- 25 mg de sulfato de hierro (II)

(pH=6,8 a 7,2)

se inyecta con una cepa de estreptomices BoP 476, se agita durante 5 días a 30° y se elabora como descrito en el ejemplo 5. La mezcla de actinomicina que se obtiene en un rendimiento de 35 mg por litro de solución de cultivo se compone, según el cromatograma de distribución anular, efectuado con el sistema 4 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 1 parte en volumen de butanol, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% de sodio m-ácido creosotínico, de seis componentes con los valores R_{c2} 0,6, 0,75, 0,8, 1, 1,2 y 1,6.

Por el contrario, la cepa de estreptomices BoP 476 sin D,L-norvalina forma un componente secundario con R_{c2} 0,6 y dos componentes principales con los valores R_{c2} 1 y 1,6.

EJEMPLO 15 -

Un caldo de la composición:

- 1 l. de agua del grifo
- 20 g de glicerina



- 4 g. de nitrato potásico
- 12 g de D,L-metionina
- 1 g de fosfato potásico sec.
- 2 g de cloruro de sodio
- 5. 250 mg de carbonato de calcio
- 50 mg de carbonato de magnesio
- 50 mg de sulfato de magnesio
- 25 mg de sulfato de hierro (II)
- 200 mg de levadura (incubada antes de la esterilización del caldo a 37° durante 3 horas)
- 10. (pH = 6,8 a 7,2)

se inyecta con cepa de estreptomices BoP 476 se agita durante 5 dias a 30° en el matraz y se elabora como descrito en el ejemplo 5. El pH final de las soluciones

- 15. de cultivo es de 7,4 ,el rendimiento de 63 mg. de actinomicina por litro de solución de cultivo. Según el cromatograma de distribución anular efectuado según el sistema de distribución 4 partes en volumen de Di-N-éter butílico, 1 parte en volumen de butanol, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% del sodio m-ácido cresotínico, la mezcla actinomicínica obtenida se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 1 y 1,6 y de un componente secundario con $R_{c2} = 0,6$. Por el contrario la cepa de estreptomices BoP 476 sin la D,L-metionina forma, con el mismo sistema de dos fases, una mezcla de actinomicina de dos componentes principales con los valores R_{c2} 1 y 1,6 y un componente secundario con $R_{c2} = 0,6$.
- 20.
- 25.

EJEMPLO 16 -
1a

- 30. Un caldo de/composición:



- 1 l. de agua del grifo
- 20 g de glicerina
- 5 g de nitrato potásico
- 8 g de formil-D-leucina
- 5. 1 g de fosfato potásico sec.
- 2 g de cloruro de sodio
- 50 mg de sulfato de magnesio
- 50 mg de carbonato de magnesio
- 10 mg de sulfato de hierro (II)
- 10. 250 mg de carbonato de calcio
- 500 mg de levadura (incubada antes de la esterilización del caldo a 37°)
- (pH = 6,8 a 7,2)

- se inyecta con la cepa de estreptomicinas BoP 476, se
- 15. agita durante 4 días a 30° y se elabora como descrito en el ejemplo 5. El pH final es de 7,4. El rendimiento asciende a 65 mg. de actinomicina por litro de solución de cultivo. La mezcla de actinomicina obtenida se compone, según el cromatograma de distribución anular, efectuado
 - 20. con el sistema de distribución 4 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 1 parte en volumen de butanol, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% de sodio m-ácido cresotínico, de tres componentes principales con los valores R_{c2} 1, 1,6, 2,35 y dos componentes secundarios con los valores 0,6 y 3,4.
 - 25.

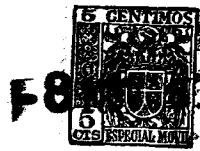
- Por el contrario forma la cepa de estreptomicinas BoP 476, sin el formil-D-leucina, una mezcla de actinomicina que, en el cromatograma de distribución anular con el mismo sistema de dos fases, se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 1 y 1,6 y un componente
- 30.



secundario con $R_{c2} = 0,6$.

EJEMPLO 17 -

- Un caldo de la composición
- 1,0 l. de agua del grifo
5. 20,0 g de glicerina
- 5,0 g de nitrato potásico
- 8,2 g de acetilo-D,L-isoleucina
- 1,0 g de fosfato potásico sec.
- 1,2 g de cloruro de sodio
10. 500,0 mg de carbonato de calcio
- 50,0 mg de carbonato de magnesio
- 20,0 mg de sulfato de hierro (II)
- 20,0 mg de sulfato de sodio
- 500,0 mg de levadura (incubada antes de esterilización del caldo durante 3 horas a 37°)
15. se pone a un valor de pH = 7 antes de esterilizar, con sosa cáustica 2-n y la solución de cultivo esteril inyectada con la cepa de estreptomices BoP 476 se agita en el matraz durante 4 días a 30°. El pH de la solución es
20. después de 7,2. La actinomicina obtenida en un rendimiento de 80 mg por litro de solución de cultivo se compone, según el cromatograma de distribución anular con el sistema de dos fases, de 4 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 1 parte en volumen de butanol, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 8% de sodio m-ácido
25. cresotínico, de los componentes principales con los valores R_{c2} 1,6 , 2,4 y 3,5 y dos componentes secundarios con los valores 0,6 y 1.
- Por el contrario, la cepa de estreptomices
30. BoP 476 sin el acetilo-D,L-isoleucina forma una mezcla de



actinomicina que, en el cromatograma de distribución anular con idéntico sistema de dos fases, se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 1 y 1,8 y un componente secundario con $R_{c2} = 0,6$.

5.

EJEMPLO 18 -

Un caldo de la composición

1, l. de agua del grifo
20 g de glicerina

10.

4 g de nitrato potásico

4 g de D-L-treonina
4 g de D,L-valina

1 g de fosfato potásico sec.
2 g de cloruro de sodio

15.

50 mg de carbonato de magnesio

25 mg de sulfato de magnesio
25 mg de sulfato de hierro (II)

250 mg de carbonato de calcio

250 mg de levadura (incubada antes de la esterilización del caldo durante 3 horas a 37°)

20.

(pH = 6,8 a 7,2)

se inyecta con cepa de estreptomices BoP 476, se agita durante 6 días a 30° en el matraz y se elabora como descrito en el ejemplo 5. El valor pH final es de 8,8

25.

el rendimiento de 40 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo. Según la comprobación en el cromatograma de distribución anular con el sistema de dos fases, 4 partes en volumen de Di-n-éter butílico, 1 parte en volumen de butanol, 5 partes en volumen de una solución

30.

acuosa al 8% de sodio m-ácido cresotínico, la mezcla



de actinomicina aislada se compone de tres componentes principales con valores R_{c2} 0,6 , 1 y 1,6 así como de un componente secundario con el valor R_{c2} 2,25.

Por el contrario la cepa estreptomices BoP 476

5. sin la D,L-treonina y D,L-valina forma una mezcla actinomicínica que, en la cromatografía de distribución anular con el mismo sistema de dos fases, se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 1 y 1,6 y de un componente secundario con el valor $R_{c2} = 0,6$.

10. EJEMPLO 19 -

Un caldo de la composición

1,0 l. de agua del grifo

20,0 g de glicerina

5,0 g de nitrato potásico

15. 6,5 g de D,L-valina

1,0 g de fosfato potásico sec.

2,0 g de cloruro de sodio

100,0 mg de carbonato de magnesio

10,0 g de sulfato de magnesio

20. 10,0 mg de sulfato de hierro (II)

1,0 g de carbonato de calcio

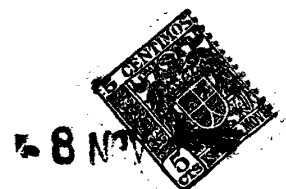
1,0 g de levadura (incubada antes de la

esterilización del caldo durante 3 horas a 37°)

25. (pH = 6,8 a 7,2)

se inyecta con cepa de estreptomices BoP 458a , se agita durante 6 días en el matraz y se prepara como descrito en el ejemplo 5. El pH final de la solución de cultivo es de 6,3 , el rendimiento de 100 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo. Según el cromatograma

30.



de distribución anular con el sistema de distribución 5 partes en volumen de amilacetato, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 10% de sodio m-ácido cresotínico, la mezcla de actinomicina obtenida se compone de un componente principal con $R_{c2} = 1,2$ y dos componentes secundarios con valores R_{c2} 0,66 y 2.

5. Por el contrario, la cepa de estreptomices BoP 458a, sin D,L-valin forma una mezcla de actinomicina que, en el cromatograma de distribución anular con el mismo sistema de distribución, se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 0,66 y 1,2 y un componente secundario con $R_{c2} = 0,2$.

10. La mezcla de actinomicina C con el sistema 5 partes en volumen de acetato amílico, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 10% de sodio m-ácido cresotínico da dos componentes principales con los valores R_{c2} 1 (actinomicina C_2), 1,55 (actinomicina C_3) y un componente secundario con el valor R_{c2} 0,66 (actinomicina C_1).

20. EJEMPLO 20 -

Un caldo de la composición

- 1 l. de agua del grifo
- 20 g de glicerina
- 5 g de nitrato potásico
- 25. 7 g de D,L-treonina
- 1 g de fosfato potásico sec.
- 2 g de cloruro de sodio
- 100 mg de carbonato de magnesio
- 25 mg de sulfato de sodio
- 30. 10 mg de sulfato de hierro (II)



1 g de carbonato de calcio

1 g de levadura (incubada antes de esterilizar el caldo durante 3 horas a 37°)

(pH=6,8 a 7,2)

5. se inyecta con cepa de estreptomices BoP 458a, se agita durante 6 dias en el matraz y se elaboran como en el ejemplo 5. El pH final de la solución de cultivo es de 7, el rendimiento de actinomicina por litro de solución de cultivo de 25 mg. Según el cromatograma de distribución anular con el sistema de distribución 5 partes en volumen de acetato amílico, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 10% de sodio m-ácido cresotínico, la actinomicina obtenida se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 0,66 y 1,2 y de cuatro componentes secundarios con los valores R_{c2} 0,4 , 1 , 1,7 y 2,1.
- 10.
- 15.

Por el contrario la cepa estreptomices BoP 458a sin D,L-treonina forma una mezcla de actinomicina que, en el cromatograma de distribución con idéntico sistema de distribución, se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 0,66 y 1,2 y un componente secundario con $R_{c2} = 0,2$.

20.

EJEMPLO 21 -

Un caldo de la composición

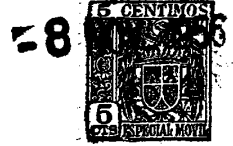
25.

- 1,0 l. de agua del grifo
20,0 g de glicerina
5,0 g de nitrato potásico
4,4 g de sarcosina
1,0 g de fosfato potásico sec.
2,0 g de cloruro de sodio

30.



- 100,0 mg de carbonato de magnesio
10,0 mg de sulfato de hierro (II)
1,0 g de carbonato de calcio
1,0 g de levadura (incubada antes de
esterilizar el caldo durante 3 horas
a 37°)
(pH = 6,8 a 7,2)
5. se inyecta con cepa de estreptomices BoP 458a, se agita durante 8 dias en el matraz y se elabora como indicado en el ejemplo 5. El pH final de la solución de cultivo es de 8,4, el rendimiento 25 mg. de actinomicina por litro de solución de cultivo. La mezcla de actinomicina que se obtiene se compone, según el cromatograma de distribución anular con el sistema de dos fases de 5 partes en volumen de acetato amílico, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 10% de sodio m-ácido cresotínico, de 3 componentes principales con los valores R_{c2} 0,35 1, 1,2 y cinco componentes secundarios con los valores R_{c2} 0,2 , 0,66, 1,55 , 1,9 y 2,2.
10. Por el contrario, la cepa de estreptomices BoP 458a forma sin sarcosina una mezcla de actinomicina que, en el cromatograma de distribución anular con idéntico sistema de distribución, se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 0,66 y 1,2 y de un componente secundario con el valor $R_{c2} = 0,2$.
15. EJEMPLO 22 -
Un caldo de la composición
1,0 l. de agua del grifo
20,0 g. de glicerina
5,0 g de nitrato potásico
20. 6,5 g de D,L-isoleucina
- 25.
- 30.



5. 1,5 g de cloruro de sodio
100,0 mg de carbonato de magnesio
10,0 mg de sulfato de hierro (II)
1,0 g de carbonato de calcio
1,0 g de levadura (incubado antes de la esterilización del caldo durante 3 horas a 37°).

(pH 6,8 a 7,2)

10. se inyecta con la cepa de estreptomicas BoP 458a, se agita durante 5 dias en el matraz y se elabora como se ha descrito en el ejemplo 5. El pH final de la solución de cultivo es de 7,5. La mezcla de actinomicina que se obtiene en un rendimiento de 70 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo se compone segun el
15. cromatograma de distribución anular con el sistema de distribución 5 partes en volumen de acetato amilico, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 10% del sodio m-ácido cresotínico, de ocho componentes con los valores R_{c2} 0,66, 1, 1,2, 1,55, 1,9, 2,7, 3,5 y
20. 4,2.

25. Por el contrario, la cepa de estreptomicas BoP 458a, ^{sin}/D,L-isoleucina forma una mezcla de actinomicina que, en el cromatograma de distribución anular con idéntico sistema de distribución, se compone de dos componentes principales con los valores 66 y 1,2 y de un componente secundario con $R_{c2} = 0,2$.

EJEMPLO 23 -

30. Un caldo de la composición
1 l. de agua del grifo
20 g de glicerina



- 5 g de nitrato potásico
8 g de D.L-leucina
1 g de fosfato potásico sec.
2 g de cloruro de sodio
5. 100 mg de carbonato de magnesio
10 mg de sulfato de hierro (II)
500 mg de carbonato de calcio
1 g de levadura (incubada antes de la esterilización del caldo durante 3 horas a 37°)
10. (pH=6,8 a 7,2)
- se inyecta con la cepa de estreptomices BoP 458a, se agita durante 5 días en el matraz y se sigue elaborando como descrito en el ejemplo 5.
15. El pH final de la solución de cultivo, es de 6,8, el rendimiento de 220 mg de actinomicina por litro de solución de cultivo. Según el cromatograma de distribución anular, efectuado según el sistema 5 partes en volumen de acetato amílico, 5 partes en volumen de una solución acuosa al 10% de sodio m-ácido cresotínico, se compone la mezcla actinomicínica de cuatro componentes principales con los valores R_{c2} 0,66, 1,2, 1,7, 2,1 y de cuatro componentes secundarios con los valores R_{c2} 0,1, 2,4 y 2,7.
- 20.
25. Por el contrario, la cepa de estreptomices BoP 548a sin D,L-leucina forma una mezcla de actinomicina que, en el cromatograma de distribución anular con idéntico sistema de distribución, se compone de dos componentes principales con los valores R_{c2} 0,66 y 1,2 y de un componente secundario con el $R_{c2} = 0,2$.
- 30.



N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente

5. indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental, y siendo lo que constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita Patente de Introducción, por 10 años en España: "Procedimiento de obtención de actinomicinas"; caracterizándose por lo siguiente:
- 10.

1º.- Procedimiento de obtención de actinomicinas, caracterizándose por la utilización de ácidos amínicos con más de dos átomos de C, o de tales compuestos que bajo las condiciones del cultivo se transformen en

15. tales ácidos amínicos, o de oligopeptidas en caldos para la obtención de actinomicinas mediante el cultivo de cepas del grupo estreptomices que formen actinomicinas.

2º.- Procedimiento de obtención de actinomicinas; tal y como queda substancialmente descrito en la presente memoria, que consta de treinta y cinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

- 20.

Madrid,

- 8 NOV. 1956

FARBENFABRIKEN BAYER Aktiengesellschaft.

J. DOMESTICO ACEBO Y MODET
P.P.