

255258



aromáticos tales como tolueno y benceno, en cloruro de metileno y en cloroformo; ligeramente soluble en tetracloruro de carbono, en agua y en éter; y relativamente insoluble en éter de petróleo.

La chalconicina es ópticamente activa, teniendo una rotación específica de $[\alpha]_D^{27} = -45,5^{\circ}$ ($c = 1$, en etanol). La punto de fusión es variable con la velocidad de cristalización y el aparato utilizado, pero en un bloque cristalizado se observa un valor de 121-123°C. La chalconicina contiene alrededor de 60% de carbono (límites de valores determinados experimentalmente 59,80% a 59,97%); alrededor de 3% de hidrógeno (límites de valores a terminados experimentalmente 3,03 a 3,32%); y alrededor de 35% de oxígeno (límites de los valores determinados experimentalmente 31,40% a 35,40%). El peso molecular de la chalconicina es alrededor de 340 (límites de los valores determinados experimentalmente 375 a 592).

En los dibujos, la figura 1 muestra el espectro ultravioleta de la chalconicina al 0,0223% en etanol absoluto. Aparece un máximo de absorción a 213 $m\mu$, $n_{11}^{13} = 519$. Hay una inflexión en la región de 240 $m\mu$. Las abscisas indican longitud de onda en milimicras.

El espectro de absorción infrarrojo de la chalconicina es altamente característico de esta sustancia. La figura 2 muestra el espectro infrarrojo de la chalconicina determinado en solución en cloroformo. (Ordenadas: % de transmisión; abscisas, longitud de onda en micras). Aparecen máximos principales de absorción a unas 2,07, 2,14, 3,40, 5,33, 5,93, 6,00, 6,13, 6,36, 7,73, 7,40, 7,59, 7,73, 8,00, 8,54, 8,70, 9,00, 9,23, 9,41, 9,57, 10,30, 10,71, 11,00, 11,57 y 11,69 micras. La figura 3 muestra el espectro de absorción infrarrojo de la chalconicina determinado en una placa de bromuro potásico. (Coordenadas, como en la figura 2). Aparecen máximos principales de absorción a unas 2,04, 2,35, 3,40, 3,01,

255258



5,39, 6,03, 6,12, 6,54, 7,30, 7,33, 7,51, 7,77, 8,33, 8,52, 9,73, 9,40, 9,33, 10,15, 11,19, 11,39 y 12,70 micras.

La chalconicina absorbe la solución acuosa de por un minuto a temperatura ambiente, obteniéndose un precipitado de tetraciclura de carbono a temperatura ambiente y se detecta un ensayo positivo de hidrogenato. La chalconicina da un ensayo de Tollens negativo, un ensayo de Fehling negativo y un ensayo de yodoformo negativo.

La chalconicina presenta las propiedades químicas de una lactona. Hay también presentes insaturación y grupos hidroxilo esterificables. Por acilación de la chalconicina con anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente, se obtiene el compuesto cristalino acetato de chalconicina.

La chalconicina absorbe hidrógeno en presencia de un metal noble como catalizador en condiciones suaves para dar una serie de productos de hidrogenación. Uno de estos productos de hidrogenación es la tetrahidrochalconicina, que se forma por hidrogenación de la chalconicina en solución acuosa a temperatura ambiente y presión atmosférica en presencia de platino catalítico y que se caracteriza fácilmente como diacetato de tetrahidrochalconicina cristalino.

Las actividades antibacterianas de la chalconicina, de sus lactonas y compuestos que contienen chalconicina y sus derivados de la chalconicina, se determinan convenientemente mediante el efecto inhibitor de tales preparaciones sobre Kreiny Lanza. La alta actividad que exhiben la chalconicina frente a este organismo se pierde tanto por hidrólisis ácida como por hidrólisis alcalina, y concretamente con respecto a la chalconicina o a su grupo cuantitativo de hidrógeno a 100°C. Se determinó en un tubo de ensayo a 100°C. en un tubo de ensayo durante

255258



Se horas en hidróxido séico 2,1 como en el caso de los.

Los productos de oxidación que resultan de la hidrólisis
ácida y de la hidrólisis alcalina de los ésteros de la sustan-
cia cristalina útiles en la identificación y caracterización
posterior de la cholecalciferol.

Los métodos analíticos y productos de oxidación de la
cholecalciferol se describen más completamente en los ejemplos que
siguen.

La cholecalciferol se caracteriza además por medio de su espec-
tro de actividad anti rickets. El espectro antibacteriano de la
cholecalciferol, expresado en términos de la única concentración in-
hibidora (microgramos/ml) frente a una variedad de microorganis-
mos, aparece en la Tabla I. Los círculos múltiples sobre cada uno
de los especies en la Tabla I representan diferentes cepas del orga-
nismo y también por similitud ilustrar la variabilidad observada
para diferentes cepas de una única especie. El valor de LD_{50} deter-
minado en estos experimentos fue cerca de 100 microgramos, cuya compo-
sición se da en "Preparates para el Tratamiento Microbiológico",
Smith, Kline, and French Biological Laboratory, Inc., Philadelphia,
Pa., U.S.A. Se muestra una relación entre un organismo
por inhibición con el crecimiento del organismo a una concentración
de cholecalciferol de unos 10 microgramos/ml, al estar ya en presen-
cia una relativa inactividad frente a un organismo por inhibición
del crecimiento del organismo a una concentración de
cholecalciferol de 55 microgramos/ml o superior.

255258



TABLA 1

ESPECTRO ANTIRACTERIANO DE LA CHALCOMICINA IN VITRO

Microorganismo	Medio de ensayo	Incubación días	Concentración inhibidora mínima microgramos/ml
<i>Coryn. diphtheriae</i>	CS* + suero**	2	50.0
<i>Diplo. pneumoniae</i>	" "	1	0.19
<i>Micro. pyog. aureus</i>	CS	1	0.05
"	"	1	0.19
"	"	1	0.19
"	"	1	0.39
"	"	1	0.19
"	"	1	0.78
"	"	1	0.09
"	"	1	0.09
"	"	1	0.09
"	"	1	0.39
"	"	1	0.19
" <i>C. Williams</i>	"	1	100.0
<i>Neisseria catarrhalis</i>	"	1	100.0
<i>Sarcina lutea</i>	"	1	0.09
<i>Strep. pyogenes</i>	"	1	0.19
"	"	1	100.0
"	"	1	25.0
"	"	1	0.78
"	"	1	25.0
<i>Strep. salivarius</i>	"	1	25.0
<i>Strep. faecalis</i>	"	1	100.0
<i>Strep. Group C sp.</i>	"	1	0.78
<i>Aerobacter aerogenes</i>	"	1	50.0
<i>Brucella suis</i>	CS + suero	2	25.0
<i>Esch coli</i>	CS	1	50.0
<i>Klebs. pneumoniae</i>	"	1	12.5
"	"	1	100.0
<i>Pasteurella multocida</i>	CS + suero	1	50.0
"	"	1	25.0
<i>Proteus vulgaris</i>	CS	1	25.0
"	"	1	25.0
<i>Pseudomonas especies</i>	"	1	25.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	"	1	25.0
<i>Salm. typhimurium</i>	"	1	50.0
"	"	1	50.0
<i>Salm. paratyphi</i>	"	1	50.0
<i>Salm. typhosa</i>	"	1	100.0
<i>Serratia marcescens</i>	"	1	50.0
<i>Shigella sonnei</i>	"	1	50.0
<i>Myco. smegmatis</i>	sintético	7	50.0
<i>Myco. tuberculosis</i>	"	7	25.0
"	sintét. + suero	7	50.0

*CS = caldo de soja

**10% (v/v)

255258



La endolecicina que se propaga en cultivo de lá-
 vado contiene una alta concentración de productos de Strepto-
myces bikiniensis en condiciones artifi-
 ciales en un medio nutritivo adecuado hasta que se obtiene el me-
 dio más activo. La actividad apreciada. Después del período
 de cultivo o incubación, puede obtenerse endolecicina más activa
 por procedimientos escritos más sencillos y puede ser elevada al
 grado de purificación ulterior deseado.

El término "cepa productora de endolecicina de Strepto-
myces bikiniensis" usada en la presente memoria significa una raza de
Streptomyces bikiniensis que, cuando se propaga en las condicio-
 nes artificiales aquí descritas, produce la formación de un resto
 del cual puede obtenerse la endolecicina por los procedimientos
 expuestos.

Se han obtenido cepas de Streptomyces bikiniensis que sirven
 para la producción de endolecicina por irradiación ultravioleta
 de actinomicetos obtenidos de suelos comunes. Uno de estos orga-
 nismos que puede utilizarse en la realización de nuestro método
 es un cultivo de un actinomiceto que fue aislado originalmente por
 dilución en serie en placas de agar nutritivo a partir de una muestra
 de suelo recogida en un campo de cañales en San Vicente, Cuba.
 Este actinomiceto produce sólo ligera actividad antibiótica
 en frente a organismos gram-negativos. La exposición a la radiación
 de ultravioleta se efectuó en un tubo de irradiación ultravioleta
 y propagamos los sobrevivientes de la radiación en un medio de
 cultivo en el cual crecieron. La cultura del actinomiceto
 puede ser elevada a un grado más alto en un medio nutritivo de
 ósmosis 7 días. Los resultados de los cultivos de la cepa
 la más activa están en el número 100-105. La actividad
 se elevó a un grado más alto. La actividad de la cepa se elevó

255258



En una caja de Petri estéril con la tapa quitada, se incubó durante un minuto bajo una lámpara germicida ultravioleta con lámparas con el banco colgado a 11,5 cm de la suspensión. La suspensión irradiada se colocó sobre agar-almidón de Anderson y se incubó durante 7 días a 36°C. Los platos se refrigeraron durante 10 días y luego se seleccionaron colonias aisladas y se transfirieron a cultivos inclinados en placas con agar-almidón de Anderson. Los cultivos se incubaron durante 3 días a 36°C. El cultivo de este estudio de una de estas colonias es una de las razas de Streptococcus
10 bikinensis útil para producir el diagnóstico de la rubeola con este procedimiento. Otras de tales cepas pueden ser obtenidas también de la misma manera.

Se han depositado cultivos de esta cepa en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, División de Investigación y Desarrollo Aplicado del Norte, Florida, Illinois, y se conservan en su colección permanente de cultivos como HALL 3737.

El organismo es un miembro aeróbico y dependiente de la luz del grupo lactinococales y pertenece al género Streptococcus tal como se describe en la séptima edición del Manual of Determinative Bacteriology de Bergay. Las características de cultivo microscópicas en medios útiles para la identificación de miembros de este género se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

255258



Características macroscópicas de cultivo de la cepa productora de chalconicina de Streptomyces bikiniensis correspondiente a NRRL 2737.

Medio de cultivo	Color del			Otras características
	Micelio aéreo	Micelio en el sustrato	Sustrato	
Glicerina	Blanco a gris	Blanco a amarillo a gris	Inalterado	Colonias convexas a pulvinadas, margen extendido, filamentosas.
Asparaguina	Blanco a gris	Canela a gris	Inalterado	Hidrólisis moderada
Agar sintético y almidón	Blanco a gris	Amarillo	Inalterado	Hidrólisis moderada
Agar de Czapek	Blanco	Blanco	Inalterado	Desarrollo pobre
Agar nutricional	Blanco	Pardo-gris	Gris oscuro	Desarrollo aéreo pobre; colonias convexas; margen filamentosos.
Agar nutricional de glucosa	Blanco a gris	Amarillo-gris a pardo-gris	Gris	Colonias pulvinadas; algunas con centros deprimidos y pliegues radiales; margen ondulado
Agar gluco - sa triptona	Blanco a gris	Gris a negro	Negro	Como arriba
Agar de esporulación de Anderson	Blanco a gris	Pardo a negro	Pardo oscuro	Colonias abombadas con centros deprimidos y pliegues radiales; margen ondulado a filamentosos.
Rebanada de patata	Blanco	Pardo-gris	Pardo cerca del desarrollo	Desarrollo aéreo pobre
Agar sintético y glucosa	Blanco a gris	Canela a gris	Inalterado	Colonias convexas a pulvinadas; margen filamentosos
Gelatina	Blanco a gris	Pardo	Pardo oscuro	Licuada, aproximadamente 1 cm en 7 días.
Lechada de tornasol	Gris	Anillo pardo-gris	Azul oscuro	Peptonización moderada
Caldo de nitrato	—	—	—	Reducido a nitrito

255258



5 Cuando se cultiva el organismo en ciertos medios de agar, el micelio aéreo es al principio blanco, volviéndose después gris. El micelio aéreo es aterciopelado, a veces ligeramente velludo y está frecuentemente cubierto con gotitas transparentes. El micelio del sustrato es blanco a amarillo o canchalo, volviéndose después gris. En medios que contienen fuentes copiosas de nitrógeno, el micelio del sustrato se vuelve con frecuencia blanco, pardo-gris o negro y en el sustrato se forma un pigmento soluble pardo oscuro o negro.

10 Las hifas aéreas son transparentes, rectas u onduladas formándose a veces lazos y ramificadas en algunos medios tales como agar de glicerina-asparaginina y agar nutritivo de glucosa. Las hifas aéreas varían en longitud y se ramifican de forma heteropolar. Las porciones distantes de las hifas aéreas se subdividen en cadenas de esporas de longitud que oscila aproximadamente de 10 a 30 micras. Las hifas vegetativas son transparentes y ramificadas de 0,8 a 1,4 micras de anchura. Las esporas son generalmente oblongas, a veces ovales o esféricas y varían en tamaño desde unas 0,8 o 1,5 micras de diámetro y de 0,8 a 2,0 micras de longitud.

20 En ensayos de utilización de carbono se obtuvo un desarrollo bueno o próspero con las siguientes fuentes sencillas de carbono: dextrosa, xilitosa, D-manosa y sacarosa. Un pobre desarrollo obtuvo o nulo con L-arabinosa, glicerina, D-lulosa, L-inosita, inulina, trealosa, D-arabita, celobiososa, melibiososa, sorbitosa, ramosa, D-sorbita, sacarosa y trealosa.

25 En el color de un micelio aéreo y en varios aspectos en su microscopía hifal, el organismo se parece al Streptomyces bikiniensis descrito por D.S. Johnston y S.I. Waksman [J. Bact. 55, 617 (1948)]. En otras características determinadas, el organismo difiere notablemente del S. bikiniensis descrito por Johnston

255258



y Jackson (tabla 5), así como del organismo conocido como S. bikiniensis descrito por Hamada (tabla 4). Nuestro organismo es considerado por tanto, como una cepa nueva y distinta de Streptomyces bikiniensis, esta se representa la nueva cepa por el número de cultivo MRL 2737.

TABLA 3

Comparación de la cepa productora de ciclosporina de Streptomyces bikiniensis correspondiente al MRL 2737 con S. bikiniensis de Johnston y Jackson.

Características	<u>S. bikiniensis</u> correspondiente al MRL 2737	<u>S. bikiniensis</u> Johnston y Jackson J. Sect. 55, 117 (1948)
Morfología células	Lazos terminales ocasionales en algunos bacilos	No notado en la descripción
Esporas	Ordinariamente oblongo, ocasionalmente oval o esférico	Oval
Desarrollo en agar sintético de Osepek	Azufre, blanco; micelio aéreo y esporas formados escasamente; sin gotitas; ningún pigmento notado	Azufre mate, blanco; velvicosos; micelio aéreo pálido con tint. blanco; micelio aéreo y esporas formados abundantemente; gotitas superficiales, de color de tabaco; pigmento notado, para el azufre
Desarrollo en agar nutritivo	Azufre con micelio aéreo pobre; pigmento azufre más oscuro	Azufre mate con micelio aéreo escaso; pigmento azufre para el azufre.



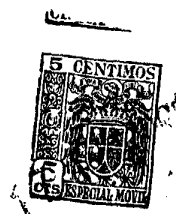
255258

TABLA 4

Comparación de la cepa productora de chalconicinas de Streptomyces bikiniensis correspondiente a NRRL 2737 con el organismo de Hamada semejante al S. bikiniensis.

Característica	<u>S. bikiniensis</u> Correspondiente a NRRL 2737	Cepa F.300 Masa Hamada se- mejante al <u>S. bikiniensis</u> J. Antibióticos, serie A 10, 74 (1957)
Conidios	Ordinariamente oblon- go, ocasionalmente oval o esférico	Elíptico
Desarrollo en agar sintético de Ozapek	Pobre, blanco; nin- gún pigmento solu- ble	Robustamente elevado, ama- rillo pálido; ningún pig- mento soluble o gris ama- rillento
Desarrollo en agar y malato cálcico	Amarillo; micelio aéreo blanco a gris	Pardo amarillento pálido; micelio aéreo blanco
Desarrollo en agar nutricio	Micelio aéreo pobre, blanco; pigmento so- luble gris oscuro	Ningún micelio aéreo; pig- mento soluble pardo negruz- co
Desarrollo en gela tina	Micelio aéreo blan- co a gris	Micelio aéreo pardo páli- do
Utilización de		
Ramnosa	0	+
Sacarosa	0	++
Lactosa	±	++
Rafinosa	0	++
Inulina	0	++
Inosita	0	++

255258



De acuerdo con el presente invento, se produce la chalconi-
cina inoculando un medio nutritivo acuoso estéril con una cepa pro-
ductora de chalconicinas de Streptomyces bikiniensis, realizando
una fermentación en condiciones aeróbicas asépticas a una tempera-
5 tura entre unos 20 y 35°C hasta que se ha comunicado a la mezcla
de fermentación una actividad antibacteriana apreciable y aislan-
do de la mezcla de fermentación la chalconicina desecada.

Para la inoculación pueden usarse esporas o conidios del
cultivo seleccionado de Streptomyces bikiniensis. Pueden emplear-
10 se convenientemente suspensiones acuosas de las esporas o conidios
que contengan una pequeña cantidad de jabón o de otro agente hu-
mectante. Para fermentaciones grandes es preferible usar cultivos
del organismo en caldo fuerte, joven, aireado y agitado.

Medios nutritivos acuosos adecuados son los que contienen
15 fuentes asimilables de carbono y nitrógeno y que tienen preferen-
tamente un pH entre alrededor de 6 y 8,5. Fuentes de carbono que
son asimilables y satisfactorias para el uso comprenden carbohi-
dratos puros que puedan ser utilizados por el organismo, así como
mezclas de carbohidratos adquiribles comercialmente. Algunos ejem-
20 plos de los materiales que son adecuados para este fin son glucosa,
maltosa, malosa, almidón y almidones modificados, jarabe de
cañiz, extractos de malta, melazas negras, glicerina, etc. La can-
tidad del carbohidrato presente en el medio nutritivo no es espe-
cialmente crítica y puede variar desde alrededor de 0,5 a 5% en
25 peso del medio. Pueden ser usadas también cantidades algo por fue-
ra de este intervalo.

Las fuentes de nitrógeno en el medio nutritivo pueden ser de
naturaleza orgánica, inorgánica u orgánica-inorgánica mixta. Algu-
nos ejemplos de las muchas sustancias nitrogenadas que pueden ser
30 empleados en el medio nutritivo son aminoácidos, peptonas, proteínas

255258



hidrolizadas y sin hidrolizar, harina de pescado, harina de soja, líquido de maceración de maíz, deshidratado o no, extractos de carne, harina de cacahuete, nitratos inorgánicos, urea, sales amónicas, etc. Debido a la naturaleza bruta de la mayoría de las fuentes de nitrógeno fácilmente adquiribles, la cantidad a añadir al medio varía según la pureza y no es posible especificar bien una cantidad definida de material fuente de nitrógeno que debe ser añadido al medio. Sin embargo, puede decirse que para los fines prácticos los materiales nitrogenados no precisan exceder del 6% en peso del medio de fermentación total y pueden estar presentes en una cantidad considerablemente inferior.

La presencia de una cierta cantidad de sales minerales y trazas de factores de crecimiento de composición desconocida es deseable a fin de obtener los mejores rendimientos de chalconicina. Muchos materiales crudos fácilmente asequibles, tales como líquido de fermentación, de maíz, residuos de fermentación butanol-acetónico, preparaciones de levadura, harina de aceite de soja y otros productos de carácter semejante contienen tales sales inorgánicas y factores de crecimiento y es deseable la inclusión de uno o más de estos materiales en el medio de fermentación. Para garantizar la presencia de cantidades adecuadas de los componentes minerales en el medio es ventajoso también en muchos casos añadir algunas sales inorgánicas tales como cloruro sódico, bicarbonato sódico, carbonato cálcico, acetato sódico, etc. La concentración preferible de sales minerales es entre 0,1 y 1% en peso del medio nutricional.

El cultivo de la cepa seleccionada de Streptomyces bikiniensis en el medio nutricional acuoso puede realizarse por un número de caminos diferentes. Por ejemplo, puede cultivarse el organismo en condiciones aeróbicas en la superficie del medio; o puede ser cul-

255258



tivado bajo la superficie del medio, esto es, en estado sumergido, con tal de que se proporcione un suministro adecuado de oxígeno.

5 El método preferible para producir chalconicina en gran escala es por fermentación de una raza productora de chalconicina de Streptomyces bikiniensis en cultivo sumergido o humedado. Según esta realización del invento, se inocula un medio nutritivo acuoso estéril con el cultivo seleccionado y se incuba con agitación y aireación a una temperatura entre unos 20 y 35°C, preferentemente 10 en las cercanías de 23-30°C, hasta que en el cultivo líquido hay presente una alta concentración de chalconicina. La duración de tiempo requerido para el rendimiento máximo de chalconicina varía con el tamaño y el tipo del aparato usado, las velocidades de agitación y aireación, el cultivo particular del organismo y otros 15 factores. En fermentaciones comerciales en gran escala realizadas en fermentadores tipo tanque, se alcanza generalmente la máxima producción de chalconicina en alrededor de 1 a 4 días. Pueden usarse también periodos de fermentación más cortos, pero generalmente producen un rendimiento inferior de chalconicina. Cuando la fermentación se lleva a cabo en matraces sacudidos, el tiempo requerido para la producción máxima de chalconicina puede ser algo mayor que cuando se usan tanques de fermentación grandes.

25 En las condiciones de cultivo sumergido, el microorganismo se desarrolla como partículas relativamente aisladas dispersas en el medio nutritivo, en contraste con la película relativamente continua presente en la superficie del medio en el método de cultivo en superficie. En virtud de esta distribución del organismo por todo el medio, pueden usarse volúmenes grandes del medio nutritivo inoculado en el cultivo del organismo en los tanques y tinas comúnmente 30 empleados en la industria de fermentación. Los fermentadores

255258



de tina estacionarios equipados con dispositivos de agitaci6n y
aireaci6n son particularmente adecuados para la producci6n de chalc
comicina en gran escala, aunque puede usarse tambi6n equipo de fer
mentaci6n de otros dise1os. Para la preparaci6n de menores canti
5 dades de chalcocomicina o para la producci6n de cultivos del orga
nismo para usarlos como in6culo para fermentaciones en gran esca
le, puede llevarse a cabo el m6todo de cultivo sumergido en peque
1os matracas o tarros que se sacuden o se agitan por medios mec6
nicos adecuados.

10 En el m6todo de cultivo sumergido, la agitaci6n y la airea
ci6n de la mezcla de cultivo pueden realizarse de varios modos.
La agitaci6n puede ser proporcionada por turbinas, paletas, moto
res u otros dispositivos mec6nicos de agitaci6n, girando o sacu
diendo el fermentador mismo, por varios dispositivos de bombeo o
15 por el paso de aire u ox6geno a trav6s del medio. La aireaci6n
puede realizarse inyectando aire u ox6geno en la mezcla de fer
mentaci6n a trav6s de tubos abiertos, tubos perforados o tubos que
contienen una secci6n porosa de difusi6n; o puede realizarse pul
verizando, rociando o esparciendo el medio en una atm6sfera que
20 contenga ox6geno o a trav6s de ella.

Una alternativa frente al m6todo, preferible, de cultivo su
mergido, es el m6todo de producci6n de chalcocomicina por cultivo en
superficie, seg6n el cual, se inocula una capa poco profunda, ge
neralmente de menos de 2cm, de medio nutricio acuoso est6ril con
25 una cepa productora de chalcocomicina de Streptomyces bikiniensis y
la mezcla inoculada se incuba en condiciones aer6bicas a una tempe
ratura entre 20 y 35°C. Entonces se aísla el producto de manera si
milar a la que se describirá para el m6todo de cultivo sumergido.

La cantidad o concentraci6n de chalcocomicina presente despu6s
30 del periodo de fermentaci6n o en cualquier tiempo durante el perio

255258



do de fermentación puede ser determinada por un ensayo biológico. Para esta finalidad, se toma de la mezcla de fermentación una parte alícuota representativa y se filtra para eliminar material sólido. La potencia antibiótica del mosto puede ser determinada entonces midiendo la inhibición del crecimiento del microorganismo Sarcina lutea en condiciones normalmente favorables al crecimiento de este organismo. Para realizar este ensayo biológico, se prepara un cultivo del organismo de ensayo en una cubeta o placa de agar. Se colocan contra la superficie del cultivo en agar discos de papel de filtro que contienen una cantidad medida del mosto diluido medido y se observa la inhibición del crecimiento del organismo después de un periodo de incubación. El ensayo biológico se funda en el hecho de que la chalconicina es característicamente antagonista del desarrollo del organismo con el resultado de que la zona de inhibición que rodea el disco de papel de filtro varía con la cantidad de chalconicina dispersa en el disco. La asignación de potencia está basada en la dilución del mosto requerida para producir una zona de inhibición de diámetro arbitrariamente elegido en las condiciones de ensayo establecidas, como se describe más concretamente en los ejemplos que siguen.

La potencia de los mostos de chalconicina puede ser determinada también por otros métodos, como midiendo la dilución del mosto requerida para dar una inhibición del 50% del crecimiento en un ensayo turbidimétrico frente a Agrobacterium tumefaciens después de un periodo de incubación de 2-3/4 horas a 37°C en un medio formado por una infusión de cerebro y corazón.

Después de completar la fase de fermentación del procedimiento, el producto deseado está presente primordialmente en el líquido de cultivo y se aísla de este líquido. Por ejemplo, en el caso de la producción de chalconicina por el método de cultivo sumergi-



do, es preferible separar el micelio por medios tales como fil-
tración o centrifugación y extraer después el mosto filtrado con
un disolvente inmiscible con agua tal como dicloruro de etilano,
cloroformo, acetato de etilo, acetato de amilo, etc. El extracto
5 resultante, que contiene la chalconicina, se somete a tratamiento
posterior dependiendo de la pureza deseada en el producto final.
Por ejemplo, el extracto orgánico se lava con base diluída, ácido
diluído y agua y se evapora a sequedad. El residuo de chalconici-
na cruda se extrae con un disolvente no polar, tal como benceno,
10 y la solución bencénica se añade sobre una columna cromatográfica
rellena de alúmina. Desarrollando y eluyendo la columna con disol-
ventes y mezclas de disolventes crecientemente polares, se obtie-
nen eluatos que contienen una alta concentración de chalconicina.
Si se desea, se realiza una purificación ulterior por recronato-
15 grafía, por recristalización en disolventes, por distribución en-
tre disolventes, por extracción en contracorriente o por una com-
binación de éstos y otros métodos semejantes. Después de una puri-
ficación preliminar por cromatografía sobre alúmina o por distri-
bución entre disolventes, puede realizarse una mayor purificación
20 por cromatografía sobre carbón activo, que puede mezclarse con tie-
rra de diatomeas. El desarrollo y la elución de la columna de car-
bón puede realizarse con disolventes hidroxílicos y cetónicos, ta-
les como metanol o metanol acuoso y acetona o acetona acuosa.

La chalconicina es un antibiótico de valor en el tratamien-
25 to de infecciones bacterianas. Por ejemplo, es activa frente a una
variedad de organismos gram-positivos. Es generalmente eficaz con-
tra estafilococos y pneumococos y es eficaz contra algunas cepas
de estreptococos. La chalconicina es especialmente valiosa en el
tratamiento de infecciones bacterianas causadas por muchos orga-
30 nismos estafilocócicos que son resistentes a otros antibióticos.

255258



Como ejemplo específico del uso de la chalconicina, puede ser empleada en forma de pomada para aplicaciones locales en una infección estafilocócica localizada.

El invento está ilustrado, pero no limitado, por los siguientes ejemplos;

Ejemplo 1; Preparación y ensayo de mostos antibióticos que contienen chalconicina.

Se prepara un medio nutritivo que tiene la siguiente composición:

10	Glucosa monohidrato	0,5%
	Glicerina	0,5%
	Caseína, hidrolizado ácido	0,5%
	Peptona, hidrolizado enzimático	0,25%
	Levadura de cervecaría	0,1%
15	Líquido de fermentación de maíz deshidratado	0,25%
	Residuo de fermentación butanol-acetánica	0,25%
	Harina de aceite de soja, extraída con disolvente	0,25%
	Cloruro sódico	0,5%
	Carbonato cálcico	0,1%
20	Agua destilada hasta hacer 100%	

Dos litros de este medio se distribuyen en porciones de 250 ml. en 8 matraces de Erlenmeyer de un litro de boca ancha, se tapan con gase y fibras de algodón y se esterilizan a 120°C durante 35 minutos. Se dejan enfriar los matraces y se inocula después cada uno con 0,5 ml de una suspensión de esporas de Streptomyces bikiniensis correspondiente a MRL 2737. Esta suspensión de esporas se prepara a partir de un cultivo inclinado de agar-maltosa de Anderson esporulado suspendiendo las esporas en 10 ml de una solución estéril de heptadecilsulfato sódico al 0,1%. Los matraces inoc-

255258



culados se incuban a 27°C durante 72 horas, proporcionando durante este tiempo aireación y agitación por un sacudidor rotatorio que describe un círculo de 6 centímetros de diámetro a 160 r.p.m.

5 Al final del período de incubación, se determina el contenido de clalcomicina del mosto por un método de difusión en agar en una bandeja con un disco de papel, semejante al que ha sido descrito para el ensayo de viomicina por Ehrlich, Iverson y Kohberger, "Antibiotics and Chemotherapy", 1, (3), 211-216 (junio 10 1951). Al adaptar este método al ensayo de la clalcomicina se emplean las siguientes modificaciones. El organismo de ensayo usado es Sarcina lutea PCI 1001 W. El inóculo para la capa de siembra se prepara desarrollando el cultivo en un medio tal como agar de siembra Penassay (Difco) en frascos Roux a 28°C durante 18 horas. Después se recogen las células en un medio tal como caldo de 15 Penassay (Difco). Las composiciones del agar de siembra Penassay y la del caldo Penassay están descritas en el "Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures", novena edición, y en "Compilation of Tests and Methods of Assay for Antibiotic Drugs", Agencia de 20 Seguridad Federal, Administración de Alimentos y Drogas. Pueden usarse también agares y caldos de composiciones similares. La suspensión de células se diluye entonces con más caldo Penassay de modo que una nueva dilución 1:10 da 16% de transmisión óptica en 25 un espectrofotómetro de Coleman Jr., modelo 6A, a una longitud de onda de 555 m μ . La suspensión de células obtenida antes de la dilución 1:10 para determinación espectrofotométrica se usa en el procedimiento de ensayo biológico.

30 Se hace una dilución 1:600 de esta suspensión de células en agar de siembra Penassay y se colocan en cada cubeta 25 ml. En es-

255258



te ensayo no se emplea ninguna capa básica. La incubación se realiza a 37°C durante 18 horas.

Al caldo antibiótico obtenido en este ejemplo se asigna una potencia de 8 unidades por mililitro. Esta asignación de potencia se basa en el hecho de que una dilución a 8 veces del mosto en tampón de fosfato de pH 7,8 (concentración final del tampón 0,1 N) dió una zona de inhibición de diámetro medio, arbitrariamente elegido, de 13,9 mm, cuando se ensayaba en las condiciones de ensayo anteriores.

Basada en las unidades de potencia definidas de esta manera se encontró que la chalconicina cristalina pura mostraba 1025 unidades por mg. Una unidad de actividad representa, por lo tanto, aproximadamente un microgramo de chalconicina.

En el ensayo de mostos de chalconicina, el patrón de referencia y las muestras se diluyen en tampones de fosfato de pH 7,8 hasta una solución final de tampón 0,1 N. Cuando se ensayen líquidos del cuerpo, el patrón de referencia y las muestras se diluyen en el líquido del cuerpo que se va a ensayar.

Ejemplo 2: Preparación y aislamiento de la chalconicina.

Se prepara un medio nutritivo que tiene la siguiente composición:

Glucosa monohidrato	0,5%
Glicerina	0,5%
Caseína, hidrolizado ácido	0,25%
Peptona, hidrolizado enzimático	0,25%
Levadura de cervecaría	0,1%
Líquido de maceración del maíz deshidratado	0,25%
Residuo de fermentación butanol-acetónica	0,25%
Harina de aceite de soja extraída con disolventes	0,25%
Cloruro sódico	0,5%

255258



Carbonato cálcico

0,1%

Agua hasta hacer 100%

5 Se colocan 12 litros de este medio en un jarro de 30 litros, con agitación, provisto de pulverizador, motor, paletas deflectoras y línea de toma de muestras. Se esteriliza el medio calentán-
dolo a 121°C durante 90 minutos. Se prepara una suspensión de es-
poras a partir de dos cultivos inclinados de agar con Streptomyces
bikiniensis esporulado correspondiente a NRRL 2737 en agar-maltosa
de Anderson, y 20 ml de una solución estéril de heptadecil-sulfato
10 sódico al 0,1%. La suspensión de esporas se usa para inocular el
medio de fermentación enfriado, el cual se incuba entonces a 26°C
durante 46 horas. Durante el curso de la incubación se mantiene la
agitación a la velocidad de 210 r.p.m. y se suministra aire a la
velocidad de 12 litros por minuto. Se añade agente antiespumante
15 a medida que se precisa.

Sesenta y cuatro litros de medio nutriente con la composi-
ción dada el principio de este ejemplo se distribuyen en porcio-
nes iguales en cuatro fermentadores de tanque de 30 litros con agi-
tación. Después de esterilizar y enfriar se inocular cada uno con
20 300 ml de la mezcla de fermentación de 46 horas recién obtenida.
La incubación se realiza a 26°C durante 24 horas con agitación a
200 r.p.m. y aireación en cantidad de 10 litros de aire por minu-
to. Se añade agente antiespumante a medida que se precisa. Las mez-
clas de fermentación se reúnen y se filtran para dar unos 57,5 li-
25 tros de mosto. Este mosto se extrae dos veces con porciones de
2,25 litros de dicloruro de etileno y el extracto orgánico se lava
sucesivamente con carbonato sódico acuoso al 2%, con ácido clorhí-
drico 0,01 normal y con agua, a continuación de lo cual se evapora
el disolvente y se extrae el residuo con benceno. La solución ben-

255258



cónica filtrada se añade sobre una columna cromatográfica, rellena con 350 g de alúmina (pH 6,9) a partir de una suspensión en benceno. Después de desarrollar la columna con 250 ml de acetato de etilo, se eluye con metanol. Se recogen eluatos metanólicos individuales y el residuo de cada uno se ensaya en cuanto a su actividad antibiótica. Los eluatos activos se reúnen y se concentran a sequedad. Una solución del residuo en 30 ml de acetona acuosa al 18% se añade sobre una columna cromatográfica preparada con 5,5 g de carbón activo. Puede usarse Darco G-60. La columna se desarrolla con acetona acuosa al 18% y el producto se recoge por elución con acetona. Los eluatos acetónicos que muestran actividad antibiótica se reúnen y se evaporan a sequedad para obtener la chalconicina deseada; $[\alpha]_D^{27} = -43,5^{\circ}$ (c = 1% en etanol). Por microanálisis se encuentra que este preparado contiene 59,84% de carbono y 8,3% de hidrógeno.

Ejemplo 3: Preparación, purificación y caracterización de la chalconicina.

Se prepara un medio nutriente (designado aquí medio C) como sigue:

20	Caseína, hidrolizado ácido	0,5%
	Lavadura de carvecoría	0,5%
	Cloruro sódico	0,5%
	Carbonato cálcico	0,25%
	Maltosa	1,0%
25	Agua hasta hacer 100%	
	Solución de hidróxido sódico (10 normal) hasta pH 7,5	

Se cargan 10 galones (38 litros) de medio C en un fermentador de acero inoxidable de 30 galones (114 litros). Después de

255258



añadir 175 ml de un agente antiespumante consistente en una mezcla de manteca cruda y aceites minerales que contengan mono- y diglicéridos, se esteriliza el medio durante 1 hora a 121°C, se enfría y luego se inocula con 30 ml de una suspensión de esporas. 5 La suspensión de esporas se prepara a partir de 3 cultivos inclinados de Streptomyces bikiniensis esporulado correspondiente a NRRL 2737 suspendiendo las esporas de cada cultivo en 10 ml de solución estéril de heptadecil-sulfato sódico al 0,1%. La mezcla de fermentación se incuba durante 33 horas a 26°C con aireación y agitación 10 suministrada por la introducción de una rápida corriente de aire a la velocidad de 6,5 pies cúbicos (184 litros) por minuto. Se añaden nuevas cantidades de agente antiespumante a medida que se precisan.

Se prepara un segundo medio nutritivo (designado medio D) como sigue: 15

Glucosa monohidrato	2,0%
Caseína, hidrolizado ácido,	0,5%
Levadura de cervicería	0,5%
Cloruro sódico	0,5%
20 Carbonato cálcico	0,25%
Agua hasta hacer 100%	
Solución de hidróxido sódico (10 normal) hasta pH 7,5.	

Se colocan unos 300 galones (1140 litros) de medio D en un fermentador de acero inoxidable de 500 galones (1900 litros) y, 25 después de añadir 1 litro de agente antiespumante, se esteriliza durante 1 hora a 121°C. Se deja enfriar el medio, se inocula con 10 galones (38 litros) de la mezcla de fermentación de 33 horas y luego se incuba durante 24 horas a 26°C. Se proporciona agitación por un agitador que opera a 84 r.p.m. y se introduce aire en la

255258



mezcla de fermentación a la velocidad de 45 pies cúbicos (1274 litros) por minuto. Se añade más agente antiespumante a medida que se precisa.

5 Se colocan unos 1200 galones (4560 litros) de medio D y 10 litros de agente antiespumante en un fermentador de acero inoxidable de 2000 galones (7600 litros) y la mezcla se esteriliza durante una hora a 121°C. Después se enfría y se inocula con 150 galones (570 litros) de la mezcla de fermentación de 24 horas obtenida del fermentador de 500 galones (1900 litros). La incubación se lleva a cabo durante 40 horas a 26°C, con aireación suministrada a 120 pies cúbicos (3396 litros) de aire por minuto y agitación adicional por un agitador que opere a 125 r.p.m. Se añaden otros 8,2 litros de agente antiespumante (o la cantidad necesaria), a medida que se precisa, para reducir la espumación.

15 Después del período de incubación, la mezcla de reacción (unos 1540 galones, 5992 litros) se recoge y se filtra. El filtrado se extrae con acetato de etilo en un extractor centrífugo a contracorriente (tal como un extractor de Podbielniak) a una velocidad de una parte de disolvente por cuatro partes de filtrado acuoso. El extracto en acetato de etilo se reúne con los extractos en acetato de etilo obtenidos de la misma manera de 5 fermentaciones similares que totalizan 3760 galones (14000 litros) de mosto. La solución total en acetato de etilo se lava bien con agua y luego se elimina el acetato de etilo por volatilización y se reemplaza por 24,1 litros de dicloruro de etileno. Se llena una columna cromatográfica de 15 cm de diámetro con 18 kg de alúmina (pH 4) a partir de suspensión en dicloruro de etileno. Se seca sobre sulfato sódico anhidro una porción de 13,9 litros de la solución en dicloruro de etileno (secada de la solución del producto de fermentación en 24,1 litros de dicloruro de etileno) y

255258



5 luego se añade sobre la columna de alúmina. La columna se desarrola y se eluye por adición sucesiva de (a) 4,5 litros de acetato de etilo: dicloruro de etileno 1:1, (b) 18,25 litros de acetato de etilo, (c) 20 litros de metanol:acetato de etilo 1:9, (d) 6,4 litros de metanol:acetato de etilo 1:1 y finalmente (e) 8 litros de agua:etanol 1:1. Las razones de disolventes indicadas son en volúmen. El eluato de la columna se recoge en fracciones y las fracciones que se encuentra que contienen una actividad antibiótica importante por ensayo biológico se reúnen y se concentran a 10 sequedad. El residuo se disuelve en acetona para dar una solución que presenta 60.000 unidades de chalcocina por ml de solución.

15 Se añade una porción de 1,5 litros de esta solución acotónica a 6,5 litros de agua y la suspensión turbia resultante se añade sobre una columna cromatográfica rellena con 1,6 Kg de carbón activo y 1,6 Kg de tierra de diatomeas. Pueden usarse materiales tales como Darco G-60 y Celite 545. La columna se desarrolla y se eluye con acetona acuosa que contenga concentraciones crecientes de acetona y finalmente con acetona. El eluato se recoge en fracciones y las fracciones que presentan actividad antibiótica se reúnen y se concentran a sequedad. Se liofiliza una solución del residuo en un pequeño volúmen de benceno para obtener 20 chalcocina como polvo amorfo. Este preparado presenta una rotación específica $[\alpha]_D^{27} = -42,5^{\circ}$ (c = 1% en etanol). Microanálisis por duplicado mostraron 59,73%, 59,97% de carbono; 3,32%, 3,29% de hidrógeno.

25 Una evidencia confirmadora de la pureza de este material es suministrada sometiendo a extracción en contracorriente. Por ejemplo, usando un extractor en contracorriente de Cassi; de 25 pisos y un sistema de disolventes consistente en n-butanol, ciclohexano y agua (9;41;50; k = 1,07), la chalcocina se aísla del 30

255258



plato nº 18. Por microanálisis, se encuentra que este producto contiene 59,84%, 59,56,5 de carbono; 8,15, 8,08,5 de hidrógeno; 82,05,5 de oxígeno. Un análisis de grupos metilo en carbono da un valor de 10,9%. El espectro de absorción ultravioleta en etanol muestra un máximo a 218 m μ , $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 519$, y una inflexión en la región de 240 m μ .

En solución cloroformica, la chalconicina muestra máximos de absorción infrarroja a unas 2,85, 3,34, 3,40, 5,83, 5,89, 6,00, 6,15, 6,86, 7,23, 7,40, 7,55, 7,78, 8,00, 8,54, 8,70, 9,00, 9,22, 9,41, 9,67, 10,20, 10,71, 11,20, 11,57 y 11,69 micras. Determinado en un disco de bromuro potásico, el espectro de absorción infrarroja muestra máximos a unas 2,94, 3,55, 3,40, 5,81, 5,89, 6,02, 6,12, 6,34, 7,20, 7,33, 7,51, 7,77, 8,08, 8,52, 9,22, 9,40, 9,63, 10,15, 11,19, 11,59 y 12,70 micras.

15 Ejemplo 4: Producción comercial de chalconicina.

Se prepara un medio nutricio como sigue:

	Glucosa monohidrato	2,0%
	Caseína, hidrolizado ácido	0,5%
	Levadura de cerveza	0,5%
20	Cloruro sódico	0,5%
	Carbonato cálcico	0,25%
	Agua (desionizada en caliente) para hacer 100%	

Unos 1200 ml de este medio se ajustan a pH 7,5 por adición de solución de hidróxido sódico 10 normal y se distribuyen 600 ml en cada uno de dos matraces de Erlenmeyer de 3 litros. Después de esterilización durante 15 minutos a 121°C, se añaden a cada uno de los matraces 5 ml de una suspensión de esporas preparada suspendiendo las esporas de un cultivo inclinado de agar de Streptomyces hirsutius esporulado correspondiente a IRRRI 2707 desarre-

255258



llado en agar-maltosa de Andersen en 10 ml de solución estéril de heptadecil-sulfato sódico al 0,1%. Entonces se realiza la incubación durante 32 horas a 27°C con agitación y aireación suministrada por una plataforma rotatoria que opera a 200 r.p.m. en un círculo de 3 cm. de diámetro.

5

20 galones (76 litros) de un medio que tenga la composición anterior se mezclan con 175 ml de agente anti-espumante y se esterilizan durante 35 minutos a 121°C en un fermentador de acero inoxidable de 50 galones (190 litros). La mezcla fría se inocula entonces con 200 ml del producto de fermentación de 32 horas y se incuba durante 40 horas a 26°C con agitación eficaz y con velocidad de aireación de 9,7 pies cúbicos (275 litros) por minuto.

10

500 galones (1840 litros) de un medio que tenga la composición dada al principio de este ejemplo se mezclan con 1 litro de agente anti-espumante y se esterilizan durante 35 minutos a 121°C en un fermentador de acero inoxidable de 500 galones (1900 litros). La mezcla fría se inocula con 20 galones (76 litros) del producto de fermentación de 40 horas obtenido del fermentador de 50 galones (190 litros) y se realiza la fermentación durante 24 horas a 26°C con agitación a 91 r.p.m. y aireación a 45 pies cúbicos (1274 litros) de aire por minuto. Se añade agente anti-espumante a medida que se precisa; se usan unos 500 ml.

15

20

Unos 3500 galones (13700 litros) de un medio que tenga la composición dada al principio de este ejemplo se esterilizan durante 35 minutos a 121°C en un fermentador de acero inoxidable de 5000 galones (19000 litros) con adición de agente anti-espumante a medida que se precise. La mezcla enfriada se inocula con 500 galones (1840 litros) del producto de fermentación de 24 horas obtenido del fermentador de 500 galones (1900 litros). La fermentación se realiza durante 40 horas a 26°C con agitación a 112 r.p.m. y ai-

25

30

255258 17



reación a la velocidad de 320 pies cúbicos (9080 litros) de aire por minuto. Se añade agente antiespumante a medida que se precisa.

5 La mezcla de fermentación (unos 3500 galones, 14400 litros) recorrida de este fermentador se filtra en dos filtros de tambor usando 125-150 libras (56,7-67,1 Kg) de tierra de diatomeas como recubrimiento previo para cada tambor y 400-500 libras (182-227 Kg.) de tierra de diatomeas para ayudar a la filtración. Puede usarse un producto tal como Celite 545. El mosto filtrado se extrae con la mitad de su volumen de dicloruro de etileno. Este extracto se reúne con extractos de cloruro de etileno obtenidos de la misma manera a partir de otros 103,175 galones (392000 litros) de una mezcla de fermentación semejante. El extracto total en dicloruro de etileno se concentra hasta jarabe a presión reducida a 15 35°C o menos. El jarabe se disuelve en 47 galones (179 litros) de metanol y la solución se extrae en un extractor centrífugo a contracorriente con 1780 galones (6764 litros) de heptano saturado con metanol. El extracto en heptano, que contiene poca actividad antibiótica, se tsecha.

20 La fase metanólica se concentra a presión reducida a menos de 20°C hasta un volumen de 10 galones (38 litros). Se llena una columna cromatográfica de 50,5 cm con 37,4Kg de carbón vegetal activo y con 37 Kg de tierra de diatomeas de una suspensión en metanol. Es satisfactorio usar Darco G-60 y Celite 545. Se vierten los 10 galones (38 litros) de solución metanólica en esta columna cromatográfica, que luego se desarrolla y se eluye con un total de 552 galones (2098 litros) de metanol y con un total de 395 galones (1492 litros) de acetona. Los eluatos metanólicos se recogen en 11 fracciones y los eluatos acetónicos se recogen en 7 fracciones. Cada una de las 18 fracciones de eluato se somete a un ensayo biológico de 30

255258



actividad antibiótica y las fracciones que muestran actividad alta se concentran a sequedad por separado a presión reducida a baños de 25°C. Los residuos de estas fracciones se disuelven en butanol terciario y las soluciones se liofilizan luego. El producto sólido total se recrystaliza entonces en butanol terciario. El producto cristalino se recoge en un filtro, se lava con butanol terciario y luego se seca a vacío a 300 micras durante 55 horas. El producto obtenido por este método es chalconicina que contiene butanol terciario de cristalización. Este butanol terciario no puede ser eliminado secando a temperatura ambiente a presión de 100 micras durante otra semana más. El producto obtenido de esta manera presenta un máximo de absorción ultravioleta a 220 m μ en etanol absoluto, $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ = 294. La rotación específica, $[\alpha]_D^{28}$ = -59,5° (c = 1% en etanol). Por microanálisis, después de pérdida del 12,77% por volatilización, se observan los siguientes valores: 59,50%, 59,73% de carbono; 8,15%, 8,14% de hidrógeno; 31,43% de oxígeno; 0,32% de cenizas.

Se encuentra por ensayo biológico que la chalconicina que contiene butanol terciario de cristalización es aproximadamente 85% tan activa frente a Sarcina lutea POI 1001 W como la chalconicina pura.

Para obtener chalconicina pura, una porción de 1445 g de la chalconicina cristalina que contiene butanol terciario de cristalización se disuelven en 2390 ml de etanol absoluto calentado a 55°C. Se añade agua (11,530 ml) con agitación constante, se añade de otros 300 ml más de etanol. La solución clara se filtra y el filtrado se mantiene a 20-24°C durante 20 horas y luego a 5-5°C durante 34 horas. Los cristales grandes, bien definidos, que se separan se recogen en un filtro, se lavan con agua helado y luego se secan en vacío. El producto así obtenido es chalconicina, que

255258



funde en un bloque calentado a unos 121-123°C y es completamente idéntica en composición y propiedades físicas a la dialcomicina purificada obtenida en los tiempos anteriores.

Ejemplo 5: Preparación de pomada antibacteriana que contiene chalconicina.

5 Se disuelve chalconicina (2 g) en una pequeña cantidad de
jalea de petróleo. Es satisfactorio usar una base de petróleo de
alta viscosidad, tal como Jelene 50-W. Se añade más jalea de pe-
tróleo o Jelene 50-W a la dispersión en porciones divididas y con
agitación hasta un peso total de 1000 g. La pomada constituida
10 así contiene una concentración de chalconicina de 0,2% en la base
de petróleo. La pomada se pasa entonces por un molino de rodillos
para pomadas con los rodillos colocados suficientemente próximos
para dar buena dispersión de la chalconicina. El producto se mez-
cla durante una hora en un mezclador de pomadas y se arte en tubos.
15 Este producto es útil para el tratamiento de infecciones por esta-
filococos por administración local.

Ejemplo 6: Preparación de diacetato de chalconicina.

Una solución de 200 mg de chalconicina en 3 ml de piridina
y 2 ml de anhídrido acético se deja en reposo a unos 35°C durante
20 48 horas y luego se concentra a sequedad en vacío. El residuo se
cristaliza en metanol acuoso para dar diacetato de chalconicina,
p. f. 143,5-150°C. Por microanálisis se encuentra que este produc-
to contiene 59,02%, 58,85% de carbono; 7,51%, 7,37% de hidrógeno;
10,50%, 11,42% de acetilo. El espectro de absorción ultravioleta
25 en alcohol muestra un máximo a 217 m μ , $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ = 281. En solución
cloroformica, se observan máximos de absorción infrarroja prominen-
tes a 2,83, 3,30, 3,37, 3,74, 3,84, 3,92, 6,02, 6,14, 6,35, 7,25,

255258



7,53, 7,50, 7,80, 8,00, 8,51, 8,90, 9,17, 9,37, 9,50, 9,63, 10,19, 10,35, 11,20, 11,53 y 11,63 micras. Este compuesto es inactivo frente a Sarcina lutea a una concentración de 500 micropapas/ml.

Ejemplo 7: Preparación de diacetato de tetrahidrochalconicina.

5 Se sacude chalconicina (0,895 g) disuelta en 30 ml de etanol en contacto con una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente y presión atmosférica en presencia de un catalizador de 5% de paladio sobre carbonato cálcico. Puede usarse también un catalizador de 5% de paladio sobre carbón. Después de un consumo de
10 unos dos moles de hidrógeno por mol de chalconicina, se elimina el catalizador por filtración y el filtrado se evapora a sequedad a presión reducida. El residuo es tetrahidrochalconicina cruda, que tiene menos del 5% de la actividad de la chalconicina frente a Sarcina lutea. Una porción de 250 mg de esta sustancia se disuelve en una mezcla de 3 ml de piridina y 2 ml de anhídrido acético. La solución se deja en reposo a temperatura ambiente durante 48 horas y luego se evapora a sequedad a presión reducida. Por
15 cristalización del residuo en metanol acuoso se obtiene diacetato de tetrahidrochalconicina, p.f. 178-179°C. Los valores de microanálisis observados son 53,79%, 53,70% de carbono; 3,43%, 3,17% de hidrógeno. Cuando se determina en un disco de bromuro potásico, aparecen máximos infrarrojos a 2,37, 3,40, 5,72, 5,84, 6,35, 7,24, 8,05, 8,23, 8,55, 8,37, 9,10, 9,34, 9,53, 9,93 y 10,33 micras. En
20 solución en etanol se observa un máximo de absorción ultravioleta a 233 m μ , $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ = 0,35. Este compuesto es inactivo frente a Sarcina lutea a una concentración de 1 mg/ml.

Ejemplo 8: Hidrólisis íctica de la chalconicina.

Una solución de 900 mg de chalconicina en 40 ml de metanol acuoso al 50%, hecho 1 ml/ml con respecto a ácido clorhídrico, se

255258



calienta a reflujo durante 10 minutos, se elimina el metanol por
destilación a presión reducida y el residuo acuoso se extrae con
tres porciones de cloroformo. El extracto cloroformico total se
evapora a sequedad y el residuo se cristaliza en una mezcla de
5 éter isopropílico y acetona. Este producto cristalino obtenido
por degradación ácida de la chalconicina funde a unos 187-189°C
y por microanálisis se encuentra que contiene 60,55%, 60,19% de
carbono; 7,95%, 8,98% de hidrógeno. Aparece un máximo de absor-
ción ultravioleta a 508 m μ , $\frac{E_{1\%}^{1\text{cm}}}{E_{1\%}^{1\text{cm}}} = 1,15$. El espectro infrarrojo
10 en un disco de bromuro potásico está caracterizado por máximos de
absorción a 2,90, 3,36, 3,45, 3,54, 5,80, 5,85, 5,95, 6,08, 6,37,
7,24, 7,35, 7,59, 7,90, 8,56, 8,73, 8,91, 9,21, 9,38, 9,56, 9,96,
10,26, 10,45, 10,67, 11,62, 12,54, 12,87 y 12,15 micras. Este com-
puesto es inactivo frente a Marcina lutea a una concentración de
15 1 mg/ml.

Ejemplo 9: Hidrólisis alcalina de la chalconicina.

Una solución de 1,05 g de chalconicina en 100 ml de metanol
acuoso al 50% hecho 0,1 molar con hidróxido sódico se deja en re-
20 poso a temperatura ambiente durante 24 horas. Se elimina el meta-
nol por vaporización y la mezcla acuosa nuevamente se lava con tres
porciones de cloroformo, que se desechan. El residuo acuoso se aci-
dula entonces a pH 2 y se extrae con 3 porciones de cloroformo. La
solución cloroformica total obtenida por extracción del medio áci-
do se concentra a sequedad en vacío. El residuo se cristaliza en
25 una mezcla de éter isopropílico y metanol. Este producto cristali-
no obtenido por degradación alcalina de la chalconicina funde a
273-273°C y no muestra ningún máximo significativo de absorción ul-
travioleta de 220 a 300 m μ . El microanálisis muestra 59,11% de
30 carbono; 3,19% de hidrógeno; 31,83% de oxígeno. El espectro de ab-

255258



serción infrarrojo determinado en un disco de bromuro potásico
cuatro máximos prominentes a 2,85, 3,59, 5,65, 5,81, 6,25, 7,20,
7,40, 8,55, 8,88, 9,20, 10,00 y 10,37 micras. Este compuesto es
inactivo frente a Sarcina lutea a una concentración de 1 mg/ml.

5 Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Esta-
dos Unidos de América el 2 de febrero de 1959, bajo el n.º 790.689,
se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto so-
bre Propiedad Industrial.

NOTA

10 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para
que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España,
por VEINTE años, son los siguientes:

15 1.º.- Procedimiento para la producción de calcoicina, ca-
racterizado porque un medio nutritivo acuoso que contiene fuentes
de carbono y nitrógeno asimilables se inocula con una cepa produc-
tora de calcoicina de Streptomyces bikiniensis y el medio inecu-
lado se incuba en condiciones aeróbicas.

20 2.º.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el
medio inoculado se incuba entre 20 y 35°C, a un pH entre 6 y 8,5
hasta que se ha comunicado al medio una actividad antibacteriana
notable.

25 3.º.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el cual
el medio inoculado se incuba entre 25 y 30°C a un pH entre 6 y 6,5
mientras que se agita dicho medio inoculado y se introduce en él
aire estéril, haciendo así que el organismo se desarrolle como par-
tículas separadas dispersas por dicho medio, la incubación se con-
tinúa en las condiciones antes dichas hasta que se ha comunicado a
dicho medio una actividad antibacteriana notable, la esteria sólida

255258



no disuelta se separa de la solución acuosa de la mezcla resultante y la calcocina se aísla de dicha solución acuosa.

4^a.- Un procedimiento para producir calcocina.

5 Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede, representado en el dibujo que se acompaña y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta y cuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 17 JUN 1980

P. A.

Alberto de Argüeso

And
T. 10

FIG.1.

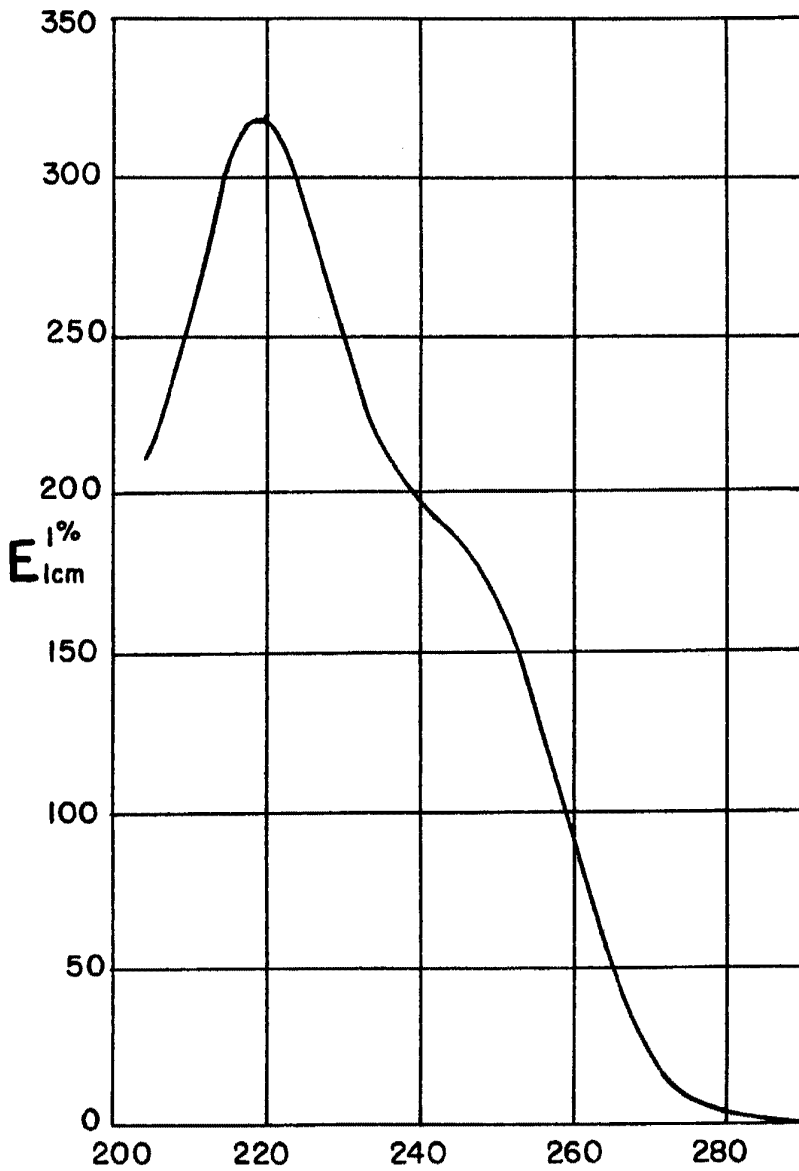


FIG.2.

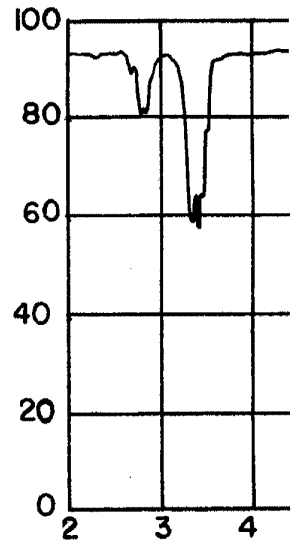
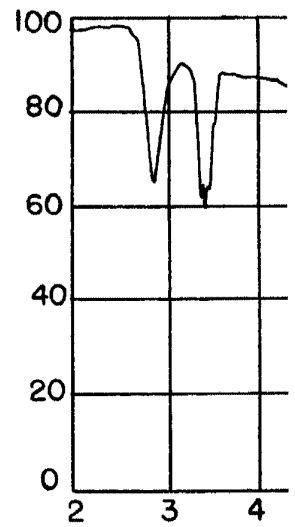
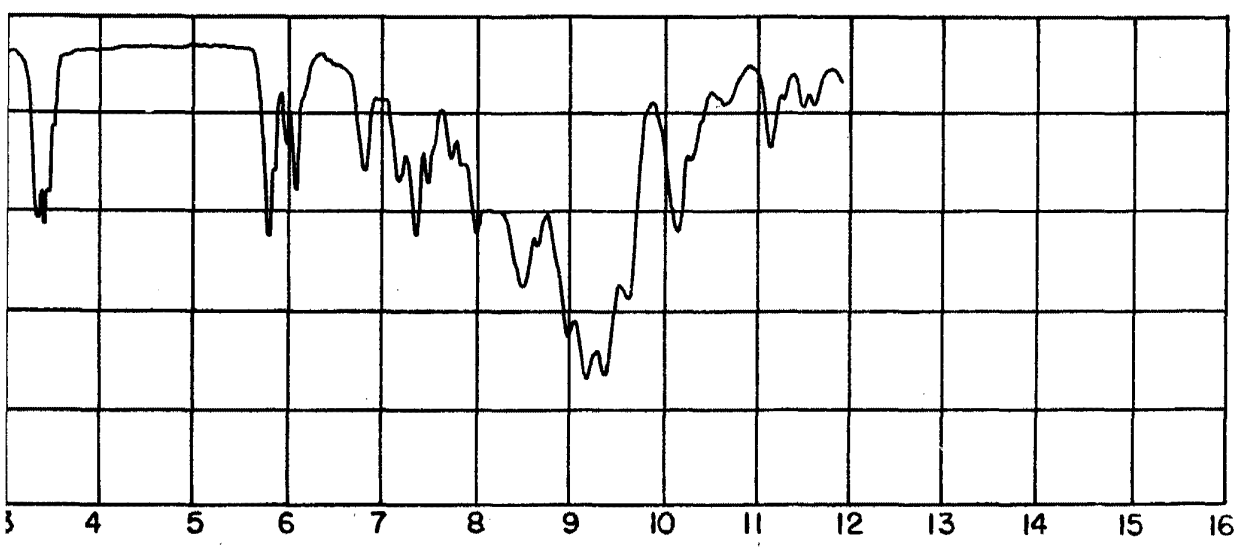


FIG.3.

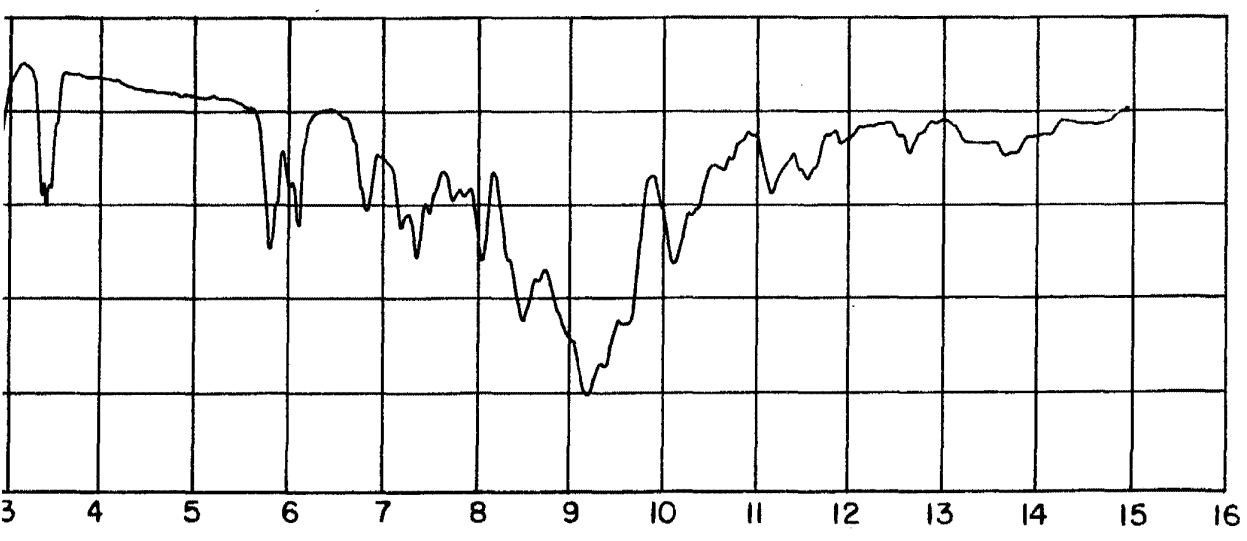




G.2.



G.3.



Handwritten scribble or signature.