

052 216  
E.P. 1960

P.- 19.519

A-46.707

Case 16373 MB/LJR



257216

**MEMORIA DESCRIPTIVA**

que se presenta para unir a la solicitud

de

**P A T E N T E D E I N V E N C I O N**

formulada el 8 de Abril de 1960, con el núm. 257.216

en

**E S P A Ñ A**

por VEINTE años

a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION SINERGICA COSINTETICA DE UN ANTIBIOTICO DE TETRACICLINA".

---

Este invento se refiere a la producción de tetraciclinas por fermentación y más en particular está relacionado con un nuevo procedimiento para la producción cosintética de un antibiótico de la serie de la tetraciclina, por ejemplo, tetraciclina, clorotetraciclina, bromotetraciclina, oxitetraciclina, 6-desmetiltetraciclina, 7-cloro-6-desmetiltetraciclina, etc., mediante

5

257216



una fermentación mixta que comprende dos o más microorganismos del género Streptomyces.

Es conocida, desde luego, la producción de antibióticos de tetraciclina por medio de fermentaciones con una cepa pura única.

5 En efecto, este es el modo ordinario de producir estos antibióticos. Véase, por ejemplo, la patente 186.883 para la producción de clorotetraciclina mediante el S. aureofaciens; patente de los EE.UU. nº 2.516.080 para la producción de oxitetraciclina por medio de S.rimosus; patente 217.171 para la producción de tetraciclina por medio de S. aureofaciens; y patente 235.737 para la producción de 6-desmetiltetraciclina y 7-cloro-6-desmetiltetraciclina por el S. aureofaciens. Las fermentaciones con cepas únicas puras se han utilizado anteriormente de modo universal para la producción de estos antibióticos, aún cuando la conservación de estas cepas puras solamente se consigue con grandes esfuerzos.

10

15

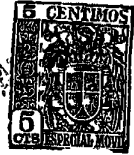
De acuerdo con el presente invento, se ha descubierto que es posible producir comercialmente importantes cantidades de los antibióticos de tetraciclina por medio de una fermentación sinérgica con dos o más microorganismos del género Streptomyces.

20 Un aspecto sorprendente del presente invento es el descubrimiento de que es posible utilizar una mezcla de dos o más cepas seleccionadas de microorganismos del género Streptomyces y obtener en muchos casos una enorme mejora o efecto sinérgico en la producción de las tetraciclinas, aún cuando dichas cepas cuando fermentan aisladamente no produzcan nada o cantidades relativamente pequeñas de los antibióticos de tetraciclina. A este fenómeno se le designa aquí como cosíntesis. Es también sorprendente el descubrimiento de que los dos términos del par de microorganismos cosintetizantes no necesitan ser de la misma especie y, en realidad, solo uno de los

25

30 componentes del par ha de ser una especie del género Streptomyces

257218



que produzca, normalmente, tetraciclina. La cepa real puede ser, por sí misma, incapaz de producir un antibiótico de tetraciclina en cantidades importantes debido a algún bloqueo metabólico. Algunas cepas de ese punto aureofaciens darán lugar a la producción cosintética de las tetraciclinas con cepas de las especies S. alb-niger, S. albus, S. griseus, etc. Análogamente, la actividad cosintética puede conseguirse utilizando especies productoras de oxitetraciclina de S. rimosus junto con una especie no productora de tetraciclina como el S. lavendulae o S. griseus.

El mecanismo exacto mediante el cual interactúan las razas sinérgicamente una con otra no se conoce completamente. Es posible que en cada par de cepas exista una cepa "donante" y una cepa "aceptora". La cepa aceptora determina de qué antibiótico de tetraciclina se mejorará la producción, y la cepa donante ayuda a esta producción. La función de una cepa en particular podrá variar dependiendo de la otra cepa con la que se empareje. En otras palabras, puede ser una cepa donante en una pareja y una cepa aceptora en otra. Si una cepa de una pareja es, por sí misma, un buen productor de un antibiótico en particular, formará, normalmente, el aceptor de una pareja de la que forme parte.

Debe destacarse que esta explicación está basada en consideraciones que no se han probado completamente en escala experimental y no se anticipa como la única posible explicación del invento. Independientemente, de la teoría, se obtiene sinergismo siguiendo la práctica y procedimientos aquí descritos.

La selección de cepas con objeto de conseguir la cosíntesis de las tetraciclinas se lleva a cabo fácilmente mediante los medios clásicos de selección de cepas que se llevan a cabo en la práctica. Un método usual consiste en inocular una placa de Petri que contenga un agar nutritivo con esporas de un cultivo después de haber tra

257216



tado las esporas con un agente mutagénico. Después de la incuba  
ción de la placa sembrada, la inspección de las colonias formadas  
demuestra que ciertas colonias se diferencian de un modo evidente  
del cultivo original en circunstancias análogas. Pueden ser cam-  
5 bios típicos del cultivo original, por ejemplo, colonias de color  
pardo oscuro en comparación con las colonias normales de color par  
do-amarillo; micro-colonias comparadas con lo normal; colonias gi  
gantes comparadas con lo normal; colonias de color amarillo páli-  
do; colonias incoloras; colonias de color verde oscuro; colonias  
10 de color rojo cobre en comparación con las colonias normales pardo-  
amarillas; colonias ásperas o lisas comparadas con las colonias nor  
males agrietadas; colonias sin pigmento difusible comparadas con  
las colonias normales que tienen un pigmento pardo-amarillo difusi  
ble; colonias con halos de difusión fluorescentes comparadas con  
15 las que no tienen halo fluorescente y combinaciones de éstas y otras  
innumerables. Aún cuando no aparezca ninguna diferenciación aparen  
te de la colonia, la variación puede presentarse frecuentemente me-  
diante la inspección de zonas aisladas elegidas arbitrariamente, por  
ejemplo, por inspección de la producción de antibiótico en la fermen  
tación en frascos con agitación del cultivo puro, mediante el exa  
20 men de los tipos de hidratos de carbono utilizados mediante un exa  
men espectrofotométrico, espectrofluorométrico o por cromatografía  
de papel o por cualquier otro sistema de inspección física, química  
o biológica que pueda hallarse disponible. Todos estos medios son  
25 normales para elegir variantes microbianos y son bien conocidos a  
las personas prácticas en la materia.

Los agentes mutagénicos que son de utilidad para la producción  
de variantes son la radiación (rayos X; ultravioleta; rayos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  
30  $\gamma$ , ; infrarroja; de microondas; cósmica; sónica), los reactivos  
químicos (mostazas nitrogenadas, mostazas de azufre, ion cobalto,

257216



colchicina, hidrocarburos polinucleares, etc., y la manipulación física (trituration). La radiación ultravioleta, los rayos X y las mostazas nitrogenadas han sido particularmente útiles como agentes mutagénicos.

5           Una vez elegido un grupo de variantes, la fase siguiente para lograr una fermentación cosintética es determinar cuales de estas variantes tienen capacidad para cooperar biológicamente. Esto puede realizarse simplemente mediante aproximaciones sucesivas, esto es, realizando fermentaciones inoculadas con parejas, ternas u

10 otras combinaciones superiores de las cepas seleccionadas y comparando la cantidad y clases de tetraciclinas producidas con las producidas por las variantes componentes cuando se utilizan en fermentaciones separadas. Sin embargo, como las variantes cosintéticas

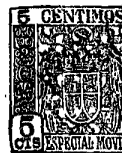
15 aparecen solo raramente, puesto que existen muchos tipos cosintéticos y dado que muchos tipos son totalmente específicos en su cooperación biológica solamente con otros determinados tipos cosintéticos, este método de aproximaciones sucesivas puede ser laborioso. Es preferible, por lo tanto, tener un término de una pareja cosintética que se sepa que funciona como tal para que sirva como orga-

20 nismo de ensayo para buscar nuevas variantes cosintetizantes. Mediante este método, se reduce el número de combinaciones a ensayar de un número muy grande para cada variante a un solo ensayo para cada una; el ensayo consiste en realizar una fermentación mixta con cada nueva variante más la variante que se conoce como cosintetizante.

25 En esta situación, el descubrimiento de una nueva variante cosintetizante viene señalado por un aumento importante en la producción de tetraciclinas en la fermentación mixta en comparación con las fermentaciones individuales utilizando los componentes a ensayar.

30           Muchos de dichos cultivos que se ha encontrado que son capaces de actuar cosintéticamente entre ellos mismos y con otras variantes,

257216



se han depositado ya en diversos depósitos como el Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois y la American Type Culture Collection Washington, D.C. En particular, hemos descubierto dos nuevas variantes de S. aureofaciens que poseen propiedades biosintéticas y bioquímicas características que sirven de ejemplo de las cepas de S. aureofaciens que son de utilidad para la realización del presente invento. Además, hemos descubierto muchas otras variantes del S. aureofaciens que pueden utilizarse en el presente invento.

Estas cepas son miembros de la especie S. aureofaciens, ya que son descendientes directos de la S. aureofaciens A377 aislada del suelo, productora de clorotetraciclina, descrita en la patente número 186.883, cuyo cultivo está depositado en el Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, como NRRL2209. Entre los agentes mutagénicos y agentes selectivos utilizados para obtener estas razas se incluyen la irradiación ultravioleta, nicotina, tratamientos con mostazas nitrogenadas y exposición bacteriófaga.

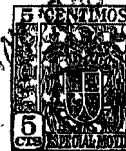
Estas cepas poseen las mismas características generales que las cepas que producen las tetraciclinas y se diferencian del mismo modo que se diferencian en general una de otra las cepas de S. aureofaciens productoras de tetraciclina y de clorotetraciclina, según se ha descrito en una serie de comunicaciones científicas que han sido publicadas,

Los datos que se dan a continuación servirán para aclarar las características de dos de estas nuevas cepas, T-219 y E-504, comparada con la cepa A-317 original disponible como NRRL 2209.

Las cepas de *Streptomyces aureofaciens* T-219 y E-504 se diferenciaron de la cepa de *Streptomyces aureofaciens* A377

(NRRL 2209) por la observación de las características de

257216



crecimiento en diversos medios incubados a 26,5°C.

1. Agar, glicerina, asparaguina, extracto de carne:

	Glicerina	10 gramos
	L-Asparaguina	0,5 gramos
5	Extracto de carne	2 gramos
	$KH_2PO_4$	0,5 gramos
	Bacto Agar	15 gramos
	Agua destilada hasta	1000 ml
	Ajustado con KOH al	
10	50% a pH	7,0
	pH, post-esteriliza	
	ción	7,2

Streptomyces aureofaciens

	<u>Cepa T-219</u>	<u>Cepa E-504</u>	<u>Cepa A-377</u>
15	Desarrollo	Bueno a abundante, pardo oscuro <sup>1</sup> a pardo intenso	Bueno, color tos tado oscuro <sup>1</sup> a par do roble <sup>1</sup>
	Hifas aéreas	Desparramadas que se hacen abundan- tes, blancas	Débil a media- no, color blan co a gris cla ro
20	Esporulación	Esparcida, se ha ce abundante en los bordes de des arrollo, gris	Ninguna Gris claro
25	Pigmento difu- sible	Amarillo claro- verde a ámbar os curo	Ambar claro Amarillo cla- ro





257219

Streptomyces aureofaciens

Medio	Cepa T-219	Cepa E-504	Cepa A-377
5 Agar nutritivo	Desarrollo medio: no: color bizco- cho <sup>1</sup> . Sin hifas aéreas. Sin pig- mento soluble. Reverso: color bizcocho <sup>1</sup>	Desarrollo escaso a mediano. Sin hi- fas aéreas. Sin pigmento soluble. Reverso: color beige <sup>1</sup> .	Buen desarrollo Sin hifas aé- reas. Pigmento soluble amari- llo claro. Reverso: amari- llo pálido.
10 Agar glucosa asparaguina ex tracto de carne	Buen desarrollo: pardo intenso <sup>1</sup> a pardo chocolate <sup>1</sup> . Abundantes a pro- fusas hifas aéreas: blanco que se vuel- ve color ciervo claro <sup>1</sup> . Esporula- ción: abundante a profuso. Pigmento soluble pardo in- tenso <sup>1</sup> . Reverso: pardo intenso <sup>1</sup> a pardo chocolate	Buen desarrollo: color camello <sup>1</sup> a pardo caoba oscu- ro. Hifas aéreas moderadas a abun- dantes, color blan- co que se vuelve gris sauce ameri- cano <sup>1</sup> a gris cení- za. Esporulación: moderada a abun- dante. Pigmento soluble amarillo claro. Reverso: color camello <sup>1</sup> a pardo caoba oscu- ro <sup>1</sup>	Buen desarrollo. Hifas aéreas de color blan- co que se vuel- ve gris al au- mentar la forma- ción de esporas. Trazas de un pigmento amari- llo naranja so- luble. Reverso: amarillo claro a rosa-naranja.
25 Agar de Waksman	Desarrollo abun- dante: pardo in- tenso <sup>1</sup> a pardo cho- colate <sup>1</sup> . Hifas aé-	Desarrollo excelen- te: color pardo caoba oscuro <sup>1</sup> . Hi- fas aéreas profu-	Buen desarrollo. Hifas aéreas medianas que se hacen abundan-
30			

257216



	reas muy profusas:	sas: color blanco	tes: color blan
	color blanco que	que se vuelve de	co a pardo tau
	se vuelve pardo	color castor <sup>1</sup> a	pe <sup>1</sup> . Pigmento
	beige <sup>1</sup> . Esporula	chocolate. Esporu	soluble amarillo
5	ción muy profusa.	lación profusa.	claro. Reverso:
	Pigmento soluble	Pigmento soluble	color camello <sup>1</sup>
	amarillo-verde a	naranja-pardo. Re	a pardo de ado
	ámbar. Reverso:	verso: pardo cao	be <sup>1</sup> .
	pardo intenso <sup>1</sup> a	ba oscuro <sup>1</sup> .	
10	pardo chocolate.		
	Ensayos en pa	Desarrollo exce-	Desarrollo profu
	tata	lente, húmedo, li	Desarrollo pro
		so, nodulado que	fuso, húmedo,
		se vuelve finamen	liso, nodulado:
15	te dentado: color	caoba oscuro <sup>1</sup> . Hi	pardo amarillo
	oliva. Hifas aé-	fas aéreas: ningu	claro <sup>1</sup> a bei-
	reas blancas abun	na a blancas abun	ge <sup>1</sup> a color ce
	dantes. Esporula-	dantes que se vuel	dro <sup>1</sup> . Sin pig
	ción: ninguna aun	ven de color cier	mento soluble.
20	que inicial. Pig-	vo claro <sup>1</sup> a color	
	mento soluble de	ciervo <sup>1</sup> con espo	
	color tostado sa-	rulación. Color	
	ddle <sup>1</sup> .	rosa taupe <sup>1</sup> a par	
		do caoba oscuro <sup>1</sup>	
		del pigmento solu	
25		ble.	
	Leche púrpura	Anillo de desarro	Anillo ligero
	considerable cris	llo definido: ro-	de desarrollo
	talino: pardo mog	jo pardo intenso <sup>1</sup>	blanco a amari
	taza <sup>1</sup> . Pigmento	a pardo caoba <sup>1</sup> sin	llo pálido. Po
30	soluble pardo cla	peptonización apa-	cos cambios de



7216

	ro <sup>1</sup> . Reacción al- calina débil pero sin peptonización aparente.	rente. Sin cambio de pH pero reac- ción alcalina in- aparente en 14 cierta de color de días.	pH importantes o peptonización aparente en 14 días.	
5		bida a la difusión del pigmento solu- ble.		
10	Agar AP6 Corn Steep <sup>2</sup>	Desarrollo abundan te: pardo <sup>1</sup> a pardo chocolate. Hifas aéreas desparrama das, color blanco que se vuelve gris en los focos. Es- porulación despa- rramada. Pigmento soluble color ám- bar intenso. Rever- so: cristalino, pardo intenso <sup>1</sup> a pardo chocolate <sup>1</sup> .	Desarrollo excelen te: pardo claro <sup>1</sup> a pardo chocolate <sup>1</sup> . Hifas aéreas abun- dantes: blancas que se vuelven de color ciervo <sup>1</sup> a co- lor castor <sup>1</sup> . Espo- rulación abundante. Pigmento soluble na- ranja-pardo intenso. Reverso: pardo cla- ro <sup>1</sup> a pardo chocola- te.	Desarrollo ex- celente. Hifas aéreas profusas. Esporulación profusa: color ciervo <sup>1</sup> . Pig- mento soluble color ámbar cla- ro. Reverso: tostado <sup>1</sup> .
15				
20				
25	Agar Q4 <sup>3</sup>	Desarrollo abundan te: pardo intenso <sup>1</sup> a pardo chocolate <sup>1</sup> . Hifas aéreas: des- parramadas, color blanco a gris cla- ro a tostado cla- ro <sup>1</sup> . Esporulación escasa. Pigmento so-	Desarrollo excelen te: color borgoña <sup>1</sup> a pardo ébano <sup>1</sup> . Hi- fas aéreas profusas: color blanco a ro- sa taupe <sup>1</sup> que se vuelve pardotaupe <sup>1</sup> . Esporulación pro- fusa. Pigmento so-	Desarrollo ex- celente: amari- llo pálido. Hi- fas aéreas pro- fusas: pardo oscuro <sup>1</sup> . Espo- rulación pro- fusa. Pigmento soluble naran-
30				





257216

	na aspara	ramifica	Diám. 0,5-	ramifica	ramifica	Diám.1,2-	
	guina ex-	do.	Diám.1,0 $\mu$	do.	Diám.	do.Diám. 1,5 $\mu$	
	tracto de	0,5-1,0 $\mu$		0,7-1,0 $\mu$		1,0-1,2 $\mu$	
	carne						
5	Agar	Flexuo-	Esferoi-	Flexuoso,	Esferoi	Flexuo-	Esferoidal
	AP4	so,conti-	dal a obo	continuo,	dal a o	so,con-	a oboide.
	Corn	nuo,rami-	ide.Diám.	ramifica	boide.	tinuo,ra	Diám.1,2-
	Steep	ficado.	0,5-1,0 $\mu$	do.Diám.	Diám.	mificado.	1,5 $\mu$
		Diám.0,5-		0,5-1,0 $\mu$	0,5-1,0 $\mu$	Diám.0,8-	
10		1,0 $\mu$				1,0 $\mu$	
	Agar	Flexuo-	Esferoi	Flexuoso,	Esferoi	Flexuo-	Esferoidal
	Waksman	so,conti	dal a obo	continuo,	dal a o	so,con-	a oboide.
		nuo,rami	ide.Diám.	ramifica	boide.	tinuo,ra	Diám.0,5-
		ficado.	0,5-1,0 $\mu$	do.Diám.	Diám.	mificado.	1,0 $\mu$
15		Diám.0,5-		0,5-1,0 $\mu$	0,5-1,0 $\mu$	Diám.0,5-	
		1,0 $\mu$				1,0 $\mu$	

La morfología del micelio y esporas de las cepas de Streptomyces aureofaciens T-219 y E-504 son aparentemente análogas una a otra y a la de la cepa original A-377.

Los cultivos viables de las cepas de S. aureofaciens E-504 y T-219, que son de utilidad en la cosíntesis descrita de las tetraciclinas, de acuerdo con el presente invento, han sido depositados en la American Type Culture Collection en Washington, D.C., en donde a estas cepas se les han asignado los números de entrada ATCC 13.191 y 13.192, respectivamente. Además, las cepas de S. aureofaciens depositadas en la American Type Culture Collection con los números de entrada ATCC 13.189 y 13.190 pueden utilizarse, así mismo, para la cosíntesis de las tetraciclinas de acuerdo con el presente invento.

Además de las cepas de S. aureofaciens citadas anteriormente

257216



y depositadas en la American Type Culture Collection, hemos encontrado que muchas otras cepas de S. aureofaciens y de todas las otras especies conocidas productoras de tetraciclinas, del género Streptomyces, como, por ejemplo, S. hygrosopicus, S. platen-  
5 sis, S. rimosus y S. viridifaciens, así como variedades elegidas adecuadamente de cada una de estas cepas pueden utilizarse en la cosíntesis de las tetraciclinas, tal como se ha descrito aquí.

Muchas cepas del género Streptomyces son capaces de lograr la cosíntesis de las tetraciclinas siempre que se hayan desarrollado en las condiciones apropiadas y se mezclen en combinaciones correctas con una o más cepas acompañantes, elegidas tal como se describió aquí en lo anterior. Las cepas de Streptomyces obtenidas de las colecciones de cultivos o aisladas del suelo, o mutantes derivados de las mismas por los procedimientos bien conocidos en la práctica, se desarrollan en las condiciones utilizadas normalmente para el cultivo de Streptomyces para la producción de antibióticos u otros productos. Los medios nutritivos contienen fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno, productos minerales esenciales y factores de crecimiento, y se formulan con ingredientes como la sacarosa, almidón, grasas animales o vegetales, líquido de maceración de maíz (Corn Steep), harina de soja, harina de semilla de algodón, levadura y diversas sales. Los cultivos se desarrollan a temperaturas de 20°-35°C en condiciones de aireación, tal como se obtienen normalmente en los frascos con agitación o aireados en tanques de fermentación agitados. Los cultivos se mezclan, en combinaciones de dos o más, de una vez al principio del período de fermentación o en algún momento durante la fermentación. En los mostos finales de fermentación se ensayan las tetraciclinas mediante los métodos usuales. La cosíntesis de tetraciclinas se demuestra en las combinaciones de cepas que dan lugar a una producción mejorada de una  
10  
15  
20  
25  
30



257216

o más tetraciclina respecto a controles fermentados aisladamente o mezclados después de la terminación del período de fermentación. Estos procedimientos se describen con más detalle en los ejemplos que sigue.

5 El invento se describirá con más detalle en relación con los siguientes ejemplos específicos.

EJEMPLO 1

Preparación de inóculos

10 Se preparó un medio de inoculación de acuerdo con la fórmula siguiente:

Sacarosa	30,0 gramos
Líquidos Corn Steep	16,5 mililitros
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 gramos
$\text{CaCO}_3$	7,0 gramos

15 Agua hasta 1000 mililitros

Partes alícuotas de ocho mililitros de este medio se colocaron en cada tubo de ensayo de una serie de tubos de 20 cm. y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a una presión de 1,05 kg/cm<sup>2</sup>. De un cultivo en agar se separaron con agua destilada estéril esporas del S. aureofaciens ATCC 13.191, formando una suspensión que contenía, aproximadamente,  $60 \times 10^6$  esporas por mililitro. Una porción de 0,33 ml. de esta suspensión se utilizó para inocular cada uno de los tubos que contenía una porción de 8 ml del medio de inoculación anteriormente indicado. El tubo de agitación inoculado se incubó a continuación durante 24 horas a 28°C en un agitador de vaivén que funcionaba a razón de 116 oscilaciones por minuto. El medio de inoculación para todas las cepas utilizadas en los ejemplos que siguen se preparó de una manera análoga.

EJEMPLO 2

30 Preparación del medio de fermentación



257216

Se preparó un medio de fermentación de acuerdo con la fórmula siguiente:

	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0 gramos
	$\text{CaCO}_3$	9,0 gramos
5	$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5 gramos
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,0 gramos
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04 gramos
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,05 gramos
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,005 gramos
10	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 gramos
	Corn Steep	25,0 gramos
	Harina de semilla de algodón	2,0 gramos
	Almidón de maiz	55,0 gramos
15	Agua hasta 1000 mililitros	

Porciones de 25 ml del medio se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml y se añadieron a cada matraz 0,5 ml de grasa de cerdo. Los matraces que contenían el medio de fermentación y la grasa de cerdo se esterilizaron en un autoclave durante 20 minutos a una presión de 1,05 kg/cm<sup>2</sup>.

### EJEMPLO 3

#### Preparación de un medio de fermentación que tenga un contenido mínimo de halogenuros

Se preparó un medio de fermentación que tenía un contenido mínimo de halogenuros en la forma siguiente:

	Corn Steep, deshalogenado con resinas	30 gramos por litro
	$\text{CaCO}_3$	7 gramos por litro
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 gramos por litro
	Almidón de bajo contenido en cloruros	55 gramos por litro
30	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 miligramos por litro

257216



$H_3PO_4$  (85%)

200 miligramos por litro

El medio se completó hasta su volumen con agua destilada. Porciones de 25 ml del medio se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml y se le añadieron a cada matraz 0,5 ml de grasa de cerdo. Los matraces se taparon con algodón y se trataron en autoclave durante 15 minutos a 120°C, enfriando a continuación a temperatura ambiente.

#### EJEMPLO 4

Cosíntesis de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina en una fermentación mixta de cepas *S. aureofaciens* ATCC 13.191 y ATCC 13.189

Se desarrollaron inóculos de *Streptomyces aureofaciens* ATCC 13.191 y *Streptomyces aureofaciens* ATCC 13.189 según se describió en el ejemplo 1. A continuación se preparó una serie de matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían porciones de 25 ml del medio de fermentación, según se ilustró en el ejemplo 2. Tres matraces de fermentación se inocularon con porciones de 1,0 ml de inóculo de *S. aureofaciens* ATCC 13.191 y otros tres matraces con inóculo de *S. aureofaciens* ATCC 13.189. Todos los matraces de fermentación inoculados se incubaron a 25°C en un agitador rotatorio, que funcionaba a 180 revoluciones por minuto, durante un período de 48 horas, al cabo de cuyo tiempo se prepararon mezclas de 20 ml de mosto de fermentación que contenía *S. aureofaciens* ATCC 13.191 y 5 ml de masa de fermentación que contenía *S. aureofaciens* ATCC 13.189, utilizando uno de los tres matraces inoculados con una cepa determinada. Los matraces restantes que contenían cepas aisladas y los matraces que contenían las mezclas de dos cepas, se incubaron de nuevo a 25°C en un agitador rotatorio durante un período adicional de 72 horas, con un tiempo total de incubación de 120 horas en todos los casos. En los matraces que contenían los mostos obtenidos con una cepa aislada en 120 horas y en los que contenían los mostos

257216



obtenidos con dos cepas durante 120 horas se ensayó la potencia en antibiótico por medio de una técnica de ensayo biológico (turbidimétrica, con *Staphylococcus aureus*) con los resultados siguientes:

	7-cloro-6-desmetiltetraciclina por bio-ensayo
<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
ATCC 13.191 edad 120 horas	< 0,5
ATCC 13.189 edad 120 horas	< 3
10 ATCC 13.191 más ATCC 13.189 mezcla dos a las 48 horas, ensayados a las 120 horas	205

#### EJEMPLO 5

15 Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de *S. aureofaciens* ATCC 13.191 y *S. aureofaciens* ATCC 13.192

Una placa de agar AP6 se sembró finamente con esporas de *S. aureofaciens* que habían sido sometidas a un agente mutagénico de mostaza nitrogenada. Después de la incubación usual, a 27°C durante 3 días, se observó una colonia extraña. Estaba caracteri-  
20 zada por un pigmento difusible verde-amarillo claramente fluorescente y un color de la colonia que se aproximaba más al color mostaza que la cepa original. Esta colonia se separó, se traspasó a un cultivo de agar Q4 y se incubó a 27°C durante dos semanas produciendo esporas. Estas esporas se utilizaron para la preparación  
25 de un inóculo de ATCC 13.192, siguiendo las indicaciones dadas en el ejemplo 1. Este inóculo, a su vez, se utilizó de la manera usual para preparar un mosto durante 24 horas para ensayar la cosíntesis. Esto se llevó a cabo como en el ejemplo precedente 4, excepto que el ATCC 13.192 se sustituyó por el *S. aureofaciens* ATCC 13.189, y  
30 la proporción de ATCC 13.192 y *S. aureofaciens* ATCC 13.191 en la

257216



mezcla fué de 50:50 en lugar de 80:20 como en el ejemplo 4. Se obtuvieron los siguientes resultados:

		Contenido en clorotetraciclina por bio-ensayo
6	<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
	ATCC 13.191 edad 120 horas	0
	ATCC 13.192 edad 120 horas	0
	ATCC 13.191 más ATCC 13.192 mezcla dos a las 24 horas, ensayados a	
10	las 120 horas	110

#### EJEMPLO 6

#### Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de

#### S. aureofaciens ATCC13.192 y S. aureofaciens S-2242

Se eligió una colonia de color rojo ladrillo oscuro no productora de antibióticos como tipo de colonia anormal de una placa de agar AP6 sembrada con esporas normales de S. aureofaciens. Esta colonia se traspasó a un cultivo de agar Q4 y se incubó a 27°C durante 17 días produciendo esporas. La cepa resultante, designada como S-2242, se ensayó en cuanto a su actividad cosintética con ATCC 13.192 del ejemplo anterior 5, utilizando la técnica esquematizada en este ejemplo 5. Además, se realizaron ensayos en una muestra compuesta de una mezcla 50:50 de los mostos madurados durante 120 horas de las fermentaciones aisladas de ambos microorganismos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

		Contenido en clorotetraciclina por bio-ensayo
25	<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
	ATCC 13.192 edad 120 horas	0
	S-2242 edad 120 horas	20
30	ATCC 13.192 más S-2242 mezclados	



a las 24 horas, ensayado a las  
 120 horas 740  
 ATCC 13.192 más S-2242 mezclados  
 y ensayados a las 120 horas 20

5 EJEMPLO 7

Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de  
 S. aureofaciens S-2242 y S. aureofaciens S-2895

El S.2895 se derivó de una suspensión de esporas de S. aureo-  
faciens tratada con mostaza nitrogenada. Este producto aislado se  
 10 seleccionó en una placa de agar AP4 (que se había sembrado con es-  
 poras de S. aureofaciens tratadas con mostaza nitrogenada) en for-  
 ma de colonia plana, grande, de color pardo-naranja brillante. La  
 colonia se traspasó a una muestra de agar Q4. Después de una in-  
 cubación a 27,5°C durante dos días, podía observarse en esta mues-  
 15 tra una fluorescencia característica de color amarillo-verdoso y se  
 observó que el material fluorescente se había difundido en el agar.  
 La fermentación con las esporas de este producto separado dió lu-  
 gar a un mosto pardo-verdoso que presentaba una fluorescencia bri-  
 llante a la luz del día ordinaria. El mosto no tenía actividad an-  
 20 tibiótica. Una fermentación mixta, utilizando el S-2242 del ejem-  
 plo 6 y el S-2895, presentaba claramente cosíntesis, cuando se rea-  
 lizó de acuerdo con el método indicado en el ejemplo 5, según se  
 presenta en los siguientes resultados del ensayo:

25	Contenido en clorotetraciclina por bio-ensayo	
	<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
	S-2242 edad 120 horas	33
	S-2895 edad 120 horas	3
30	S-2242 más S-2895 mezclados a las 24 horas, ensayados a las 120 horas	424

257216

EJEMPLO 8Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta deS. aureofaciens S-2895 y S. aureofaciens ATCC 12.750

Se desarrollaron inóculos de S. aureofaciens S-2895 obteni  
 5 dos como se indicó en el ejemplo 7 y S. aureofaciens ATCC 12.750,  
 de acuerdo con las instrucciones dadas en el ejemplo 1. Se prepa  
 raron, a continuación, tal como se describió en el ejemplo 2, una  
 serie de matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían porciones de  
 25 ml del medio de fermentación. Tres de estos matraces de fermen  
 10 tación se inocularon con porciones de 1,0 ml de S.2895 y otros  
 tres matraces con inóculo de S. aureofaciens ATCC 12.750. Todos  
 los matraces de fermentación inoculados se incubaron a 25°C en un  
 agitador rotatorio que actuaba a 180 revoluciones por minuto duran  
 te un período de 24 horas. El cultivo de 24 horas de S-2895 se mez  
 15 cló entonces en la proporción 50:50 con el cultivo de 24 horas de  
S. aureofaciens ATCC 12.750. Los matraces restantes que contenían  
 cepas aisladas, así como los matraces que contenían las mezclas de  
 dos cepas, se incubaron nuevamente a 25°C en un agitador rotatorio  
 durante otras 96 horas, con un tiempo total de incubación de 120  
 20 horas en todos los casos. Los matraces que contenían mostos de una  
 sola cepa madurados 120 horas y los que contenían mostos de dos ce  
 pas madurados 120 horas, se ensayaron dando los resultados siguien  
 tes:

<u>Microorganismos</u>	Contenido en clorotetraciclina	
	por bio-ensayo	
	<u>mcg/ml</u>	
S-2895 edad 120 horas	3	
ATCC 12.750 edad 120 horas	331	
S-2895 más ATCC 12.750 mezclados a		
30 las 24 horas, y ensayados a las 120 horas	38,60	

257216

EJEMPLO 9Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta deS. aureofaciens S-2895 y S. aureofaciens E-475

El material de un mosto maduro de S. aureofaciens se rayó  
 5 en agar AP6 mediante el método de dilución por rayado y se incu-  
 bó a 27,5°C. Se eligió una colonia que se presentaba mayor y de  
 color más pálido que las típicas de la cepa original, se aisló y  
 se extendió en un cultivo inclinado de agar. Después de la espo-  
 10 rulación, este producto separado E-475 se utilizó en una fermen-  
 tación. El mosto resultante era de color rojo-pardo oscuro y no  
 contenía clorotetraciclina. Cuando se mezcló en la fermentación  
 con S-2895, obtenido como se indicó en el ejemplo 7, se cosinte-  
 tizó la clorotetraciclina, según se dedujo de un aumento de la ac-  
 15 tividad antibiótica frente al Staphylococcus aureus, que corres-  
 ponde a 830 microgramos de clorotetraciclina por mililitro de mos-  
 to madurado durante 120 horas.

EJEMPLO 10Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta deS. aureofaciens S-2895 y S. viridifaciens ATCC 11.989

20 Se llevó a cabo una fermentación mixta de S-2895, obtenido  
 según se indicó en el ejemplo 7, y S. viridifaciens ATCC 11.989,  
 como se describió en el ejemplo 8. Además, se realizaron ensayos  
 en una muestra compuesta de una mezcla 50:50 de los mostos madu-  
 rados 120 horas de las fermentaciones aisladas de ambos microor-  
 25 ganismos con los siguientes resultados:

	Contenido en clorotetraciclina por ensayo fluorométrico
<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
S-2895 edad 120 horas	0
30 ATCC 11.989 edad 120 horas	180

257216



	S-2895 más ATCC 11.989, mezclados a las 24 horas, ensayados a las 120 horas	310
5	S-2895 más ATCC 11.989, mezclados y ensayados a las 120 horas	80

EJEMPLO 11

Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de

S. aureofaciens S-2895 y S. aureofaciens ATCC 12.551

Utilizando el método descrito en el ejemplo 8, se llevó a cabo una fermentación mixta de S-2895, obtenido como se indicó en el ejemplo 7, y S. aureofaciens ATCC 12.551, con los siguientes resultados:

		Contenido en clorotetraciclina por ensayo fluorométrico
15	<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
	S-2895 edad 120 horas	0
	ATCC 12.551 edad 120 horas	60
	S-2895 más ATCC 12.551 mezclados a las 24 horas, ensayado a las	
20	120 horas	375

EJEMPLO 12

Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de

S. aureofaciens S-2895 y S. aureofaciens ATCC 10.762

Se utilizaron en una fermentación mixta, de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 10, S-2895, obtenido según se describió en el ejemplo 8, y S. aureofaciens ATCC 10.762. Los resultados se indican a continuación:

		Contenido en clorotetraciclina por bio-ensayo
30	<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>



257216  
< 2

S-2895 edad 120 horas  
 ATCC 10.762 edad 120 horas 24  
 S-2895 más ATCC 10.762 mezclados  
 a las 24 horas, ensayados a las  
 5 120 horas 181  
 S-2895 más ATCC 10.762 mezclados  
 y ensayados a las 120 horas 8

EJEMPLO 13

Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de

10 S. aureofaciens S-2895 y S. aureofaciens V-655

Una suspensión de esporas de S. aureofaciens ATCC 12.748 se aplicó en placas de agar AP6 de modo que pudieran distinguirse las colonias individuales. Se aislaron varias colonias que parecían típicas de la cepa. Una de estas colonias produjo un  
 15 aspecto distinto del tipo normal, en un cultivo inclinado de agar Q4, siendo el desarrollo muy oscuro, casi negro. Se preparó un inóculo según se indicó en el ejemplo 1. La fermentación, en el medio descrito en el ejemplo 2, dió lugar a un mosto coloreado de verde oscuro que no contenía ni clorotetraciclina ni otra  
 20 actividad antibiótica. Cuando este producto aislado V-655 se desarrolló en una fermentación mixta con S-2895, de acuerdo con el procedimiento indicado en el ejemplo 8, se obtuvieron los siguientes resultados:

25	<u>Microorganismos</u>	Contenido en clorotetraciclina
		por bio-ensayo
		<u>mcg/ml</u>
	S-2895 edad 120 horas	< 2
	V-655 edad 120 horas	< 2
30	S-2895 más V-655 mezclados a las 24 horas, ensayados a las 120 horas	1160

257216

EJEMPLO 14Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta deS. aureofaciens ATCC 13.189 y S. aureofaciens ATCC 12.749

Se llevó a cabo una fermentación mixta de S. aureofaciens  
 5 ATCC 13.189 y S. aureofaciens ATCC 12.749, de acuerdo con el mé-  
 todo indicado en el ejemplo 10. Los mostos recogidos a las 120  
 horas se ensayaron en cuanto a su potencia antibiótica con los  
 resultados siguientes:

	Contenido en clorotetraciclina por bio-ensayo
<u>Cepa Nº</u>	<u>mcg/ml</u>
ATCC 13.189 edad 120 horas	3
ATCC 12.749 edad 120 horas	279
ATCC 13.189 más ATCC 12.749 mezcla	
15 dos a las 48 horas, ensayado a las 120 horas	4770
ATCC 13.189 más ATCC 12.749 mezcla	
dos y ensayados a las 120 horas	121

EJEMPLO 1520 Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta deS. aureofaciens ATCC 12.749 y S. aureofaciens ATCC 13.190

Una fermentación mixta de S. aureofaciens ATCC 12.749 y  
S. aureofaciens ATCC 13.190 se realizó de acuerdo con la técnica  
 indicada en el ejemplo 8, excepto que la mezcla se llevó a cabo  
 25 a las 48 horas en vez de a las 24 horas y que la proporción de  
 la mezcla fué de 92% de S. aureofaciens ATCC 12.749 y 8% de S.  
aureofaciens ATCC 13.190, en lugar de una mezcla 50:50. Los  
 mostos madurados 120 horas se ensayaron con los resultados si-  
 guientes:

257216



Contenido en clorotetraciclina  
por ensayo fluorométrico

<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
ATCC 12.749 edad 120 horas	160
5 ATCC 13.190 edad 120 horas	15
ATCC 12.749 más ATCC 13.190 mezcla dos a las 48 horas, ensayados a las 120 horas	4200

EJEMPLO 16

10 Efecto de mezclar cepas cosintéticas a diversos períodos de tiempo

Se desarrollaron inóculos de Streptomyces aureofaciens ATCC 12.748 y S. aureofaciens ATCC 13.190 según se describió en el ejemplo 1. El medio de fermentación se preparó tal como se indicó en el ejemplo 2. Una serie de matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían porciones de 25 ml de este medio de fermentación se esterilizaron y se enfriaron. La mitad de estos matraces se inocularon con 1,0 ml cada uno de inóculo de S. aureofaciens ATCC 12.748 y el resto con 1,0 ml de S. aureofaciens ATCC 13.190. Se preparó, asimismo, una mezcla 50:50 formada por 12,5 ml de medio de fermentación que contenía S. aureofaciens ATCC 12.748 y 12,5 ml de medio de fermentación que contenía S. aureofaciens ATCC 13.190. Todos los matraces que contenían medio de fermentación inoculado se incubaron a continuación a 25°C en un agitador rotatorio que funcionaba a 180 revoluciones por minuto. A intervalos de 24, 48, 72 y 96 horas, se prepararon otras combinaciones 50:50 de dos cepas mezclando una porción de 12,5 ml de mosto de fermentación de S. aureofaciens ATCC 12.748 con dicha edad de 24, 48, 72 ó 96 horas con una porción de 12,5 ml de S. aureofaciens ATCC 13.190 obtenida con una edad análoga. En los casos de matraces que contenían cepas aisladas y matraces que contenían mezclas de dos ce-

257216



pas, el período de incubación total en las condiciones indicadas anteriormente fué de 120 horas. Cuando se trataba de mezclas de dos cepas, el período de incubación de 120 horas fué el total del período de tiempo de fermentación de la cepa aislada antes de mezclada (24, 48, 72 y 96 horas, respectivamente) y el período de fermentación de las dos cepas después de mezcladas (96, 72, 48 y 24 horas, respectivamente), los mostos recogidos a las 120 horas se ensayaron a continuación en cuanto a su contenido en clorotetraciclina por medio del ensayo fluorométrico. Los resultados de los ensayos se relacionan a continuación:

		Contenido en clorotetraciclina por ensayo fluorométrico edad 120 horas	
	<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>	
15	ATCC 12.748	110	
	ATCC 13.190	10	
	ATCC 12.748 más ATCC 13.190 mezcla		
	dos al cabo de		
	0 horas	1390	
20	24 horas	700	
	48 horas	1470	
	72 horas	1100	
	96 horas	280	

#### EJEMPLO 17

#### Efectos de diferentes composiciones en tanto por ciento de mezclas de cepas cosintéticas

Los inóculos de Streptomyces aureofaciens ATCC 12.748 y S. aureofaciens ATCC 13.190 se desarrollaron según se describió en el ejemplo 1. El medio de fermentación se preparó como se indicó en el ejemplo 2. Una serie de matraces Erlenmeyer de 250 ml

257216



que contenían porciones de 25 ml de este medio de fermentación se esterilizaron y se enfriaron. La mitad de estos matraces se inocularon con porciones de 1,0 ml de inóculo de S. aureofaciens ATCC 12.748 y el resto con porciones de 1,0 ml de inóculo de

5 S. aureofaciens ATCC 13.190. Todos los matraces que contenían el medio inoculado se incubaron a continuación a 25°C en un agitador rotatorio que funcionaba a 180 revoluciones por minuto, durante 48 horas. Al final del período de incubación de 48 horas, se combinaron diferentes cantidades del mosto de fermentación de

10 S. aureofaciens ATCC 12.748 y de S. aureofaciens ATCC 13.190 de tal manera que produjeran un volumen total de 25 ml, dando mezclas de dos cepas que tenían diversas proporciones relativas de los dos mostos de fermentación. Todos los matraces que contenían cepas aisladas y todos los que contenían mezclas de dos cepas se incubaron de nuevo a 25°C en un agitador rotatorio durante otras 72 horas, de modo que el tiempo total de incubación, en todos los casos, fuese de 120 horas. Los mostos recogidos a las 120 horas se ensayaron a continuación en cuanto a su contenido en clorotetraciclina por medio de métodos fluorométricos y ensayos biológicos

15 (turbidimétrico, con S. aureus). Los espectros de absorción en el ultravioleta de los diversos mostos de fermentación mixta con dos cepas presentaban máximos a 368m $\mu$ , que corresponden a clorotetraciclina. Los resultados de los ensayos fueron los siguientes:

20

Contenido en clorotetraciclina

por ensayo fluorométrico

al cabo de 120 horas

mcg/ml

25

S. aureofaciens ATCC 12.748 desarrollo solo

110

30

S. aureofaciens ATCC 13.190 desarrollo

257216



lado solo

10

Combinaciones: (desarrolladas como pares cosintéticos)

	<u>S. aureofaciens</u>		
	<u>ATCC 12.748</u>	<u>ATCC 13.190</u>	
	<u>%</u>	<u>+</u>	<u>%</u>
5	100		0
			110
	96		4
			2450
	92		8
			2280
	84		16
			2960
10	68		32
			2180
	60		40
			2140
	40		60
			820
	32		68
			330
	16		84
			100
15	8		92
			100
	4		96
			20
	0		100
			10

EJEMPLO 18

Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de

20 S. aureofaciens ATCC 12.749 y S. aureofaciens V-655

Se llevó a cabo una fermentación mixta utilizando el método descrito en el ejemplo 8 y combinando el S. aureofaciens ATCC 12.749 con el producto aislado V-655 que se obtuvo tal como se indicó en el ejemplo 13. Los resultados de los ensayos son los siguientes:

25

Contenido en clorotetraciclina  
por bio-ensayo

<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
ATCC 12.749 edad 120 horas	463
30 V-655 edad 120 horas	< 2



ATCC 12.749 más V-655 mezclados  
 a las 24 horas, ensayado a las  
 120 horas

1810

EJEMPLO 19

5 Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de  
S. aureofaciens V-655 y S. aureofaciens S-2242

El V-655 se obtuvo según se indicó en el ejemplo 13. El  
 S-2242 se obtuvo por el método indicado en el ejemplo 6. Se lle-  
 10 vó a cabo una fermentación mixta utilizando la técnica ilustrada  
 en el ejemplo 8 con estos dos productos aislados. Los resultados  
 de los ensayos fueron los siguientes:

	Contenido en clorotetraciclina por bio-ensayo
<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
15 V-655 edad 120 horas	< 2
S-2242 edad 120 horas	< 2
V-655 más S-2242 mezclados a las 24 horas, ensayado a las 120 horas	124

EJEMPLO 20

20 Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de  
S. aureofaciens V-655 y S. aureofaciens ATCC 13.192

La cosíntesis de la clorotetraciclina en este ejemplo se rea-  
 lizó mediante la fermentación mixta del V-655, obtenido según se  
 indicó en el ejemplo 13, y S. aureofaciens ATCC 13.192, siguiendo  
 25 el método indicado en el ejemplo 8. Los resultados de los ensa-  
 yos se indican a continuación:

	Contenido en clorotetraciclina por bio-ensayo
<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
30 V-655 edad 120 horas	< 2



ATCC 13.192 edad 120 horas

< 2

V-655 más ATCC 13.192, mezclados  
a las 24 horas, y ensayado a las  
120 horas

257216

416

5

EJEMPLO 21

Cosíntesis de tetraciclina en una fermentación mixta de

S. aureofaciens ATCC 13.192 y S. hygroscopicus (A 9538-1)

Se llevó a cabo una fermentación mixta de S. aureofaciens  
ATCC 13.192 y S. hygroscopicus utilizando el método descrito en  
10 el ejemplo 10. Los resultados de los ensayos se indican a conti-  
nuación:

	<u>Ensayo</u>
<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml.</u>
ATCC 13.192 edad 120 horas	0
15 <u>S. hygroscopicus</u> (A-9538-1) edad 120 horas	640 (oxitetraciclina)
ATCC 13.192 más <u>S. hygroscopicus</u> , mezclados a las 24 horas, ensayado a las 120 horas	350 (oxitetraciclina) + 250 (tetraciclina)
20 ATCC 13.192 más <u>S. hygroscopicus</u> mezclado y ensayado a las 120 horas	350 (oxitetraciclina)

EJEMPLO 22

Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de

25 S. aureofaciens ATCC 12.749 y S. aureofaciens V-15

Este producto aislado, el S. aureofaciens V-15, se seleccio-  
nó de una placa de agar AP4 en forma de colonia naranja-parda tí-  
pica de su antecesor S. aureofaciens que, a su vez, se había deri-  
vado de un productor de clorotetraciclina tratado mutagénicamen-  
30 te. Este aislado dió lugar a un mosto rojizo que no contenía ac-

257216 24



tividad antibiótica. Una fermentación mixta de V-15 con

S. aureofaciens ATCC 12.749, de acuerdo con el método indicado en el ejemplo 8, excepto que la mezcla se llevó a cabo a las 48 horas en vez de a las 24, dió los resultados que se indican a continuación:

5

<u>Microorganismos</u>	Contenido en clorotetraciclina	
	Ensayo fluorométrico <u>mcg/ml</u>	bio-ensayo <u>mcg/ml</u>
ATCC 12.749 edad 120 horas	170	182
10 V-15 edad 120 horas	20	< 2
ATCC 12.749 más V-15 mezcla dos a las 48 horas, ensayado a las 120 horas	2250	2738

EJEMPLO 23

15 Cosíntesis de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina en una fermentación mixta de V-15 y S. aureofaciens ATCC 13.191

Según se indicó en el ejemplo 22, el aislado v-15 dió lugar a un mosto rojo que contenía muy poca actividad antibiótica. Cuando el S. aureofaciens ATCC 13.191 se desarrolló en el medio de fermentación descrito en el ejemplo 2, no produjo ningún anti-  
20 biótico de tetraciclina ni actividad antibacteriana (ensayo turbidimétrico con S. aureus). En una fermentación mixta utilizando V-15 y S. aureofaciens ATCC 13.191 (3 ml de mosto V-15, 48 horas, agregados a 25 ml de mosto de S. aureofaciens ATCC 13.191, 48 ho-  
25 ras; cosechados a las 120 horas) el mosto resultante contenía, aproximadamente, 200 mcg/ml de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina.

EJEMPLO 24

Cosíntesis de 6-desmetiltetraciclina en una fermentación mixta de S. aureofaciens ATCC 13.191 y S. aureofaciens A-8291

30 Una muestra de suelo se lixivió con agua destilada estéril.



257216

24

Este agua de lixiviación se diluyó, posteriormente, con un gran volumen de agua destilada estéril y partes alícuotas de esta solución diluída se introdujeron en placas de agar nutritivo AP6. Las colonias resultantes produjeron un olor característico intenso a tierra. Se seleccionó una colonia que era de color verde-amarillo pálido, translúcida, con bordes sin pigmentar y por la inspección taxonómica mostró ser de S. aureofaciens. Este cultivo se propagó de la manera usual y la masa de fermentación fue de color gris oscuro. Este cultivo se designó como A-8291.

Se desarrollaron inóculos de S. aureofaciens ATCC 13.191 y A-8291 según se describió en el ejemplo 1. Se preparó una serie de matraces que contenían el medio de fermentación descrito en el ejemplo 2. La mitad de estos matraces se inocularon con S. aureofaciens ATCC 13.191, y la mitad con A-8291. Todos estos matraces se incubaron durante 30 horas a 25°C. Al cabo de este tiempo, se combinaron volúmenes iguales de las dos fermentaciones separadas, se añadieron 10 ppm de 2,5-dimercapto-1,3,4-tiadiazol (DMTD) a la mezcla y la fermentación se continuó hasta 120 horas. Simultáneamente, se añadieron a las fermentaciones aisladas 10 ppm de DMTD y estas fermentaciones se continuaron hasta 120 horas. Después de la cosecha, se obtuvieron los siguientes resultados:

Contenido en 6-desmetiltetraciclina  
por bio-ensayo

<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
ATCC 13.191 edad 120 horas	< 5
A-8291 edad 120 horas	< 5
ATCC 13.191 más A-8291 mezclados a las 30 horas, ensayados a las 120 horas	100

30

257216



EJEMPLO 25

Cosíntesis de bromotetraciclina en una fermentación mixta de  
S. aureofaciens A-8291 y S. aureofaciens ATCC 12.751

5 Se preparó un medio de bajo contenido en halogenuros según  
se describió en el ejemplo 3 y se le añadieron 200 mg por litro  
de bromuro potásico (exento de cloruro). Matraces separados de  
este medio se inocularon con A-8291 obtenido según se describió  
en el ejemplo 24, y con S. aureofaciens ATCC 12.751. A las 24  
horas, se mezclaron volúmenes iguales y se continuó la fermenta  
10 ción de las muestras separadas y mezcladas durante otras 96 horas.  
Los resultados de los ensayos se indican a continuación:

	Contenido en bromotetraciclina por ensayo fluorométrico
<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
15 A-8291 edad 120 horas	< 25
ATCC 12.751 edad 120 horas	< 5
A-8291 más ATCC 12.751 mezclados a las 24 horas, ensayados a las 120 horas	550

20

EJEMPLO 26

Cosíntesis de oxitetraciclina en una fermentación mixta de  
S. aureofaciens ATCC 13.192 y S. rimosus ATCC N° 10970,  
mutante O-1066

25 Una suspensión de esporas de S. rimosus ATCC 10.970 se ex-  
puso al efecto mutagénico de los rayos X y las esporas expuestas  
se utilizaron posteriormente para sembrar una placa de agar nutri-  
tivo AP6. Se eligió una colonia pigmentada de forma extraña, de  
signada como O-1066 y se obtuvo cantidad de esporas de la manera  
usual. Mezclando un cultivo durante 24 horas en un matraz con agi-  
30 tación de este aislado con una preparación similar de ATCC 13.192

257216



y continuando la fermentación mixta resultante durante otras 96 horas, el mosto madurado indicó la cosíntesis de oxitetraciclina por los resultados siguientes:

	Contenido en oxitetraciclina por bio-ensayo
<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
ATCC 13.192 edad 120 horas	< 10
O-1066 edad 120 horas	< 2
ATCC 13.192 más O-1066 mezclados a las 24 horas, ensayados a las 120 horas	187

EJEMPLO 27

Cosíntesis de tetraciclina en una fermentación mixta de  
S. aureofaciens ATCC 13.192 y S. aureofaciens E-1018

Una muestra típica de E-475, indicada en el ejemplo 9, se expuso a la mostaza nitrogenada. La suspensión de esporas tratada se utilizó para inocular placas de agar AP6. Después de la inoculación, una colonia oscura brillante, aislado E-1018, que se diferenciaba de aspecto de las colonias restantes en la placa, se extendió en agar Q4 de esporulación y se desarrolló hasta que se habían formado esporas. La fermentación en el medio indicado en el ejemplo 2 dió lugar a un mosto rojo-pardo oscuro que no contenía clorotetraciclina y que se diferenciaba de la E-475 en los cromatogramas de papel y en su imagen espectrofotométrica. Se realizó una fermentación mixta de ATCC 13.192, obtenida como en el ejemplo 5, y E-1018, de acuerdo con las normas indicadas en el ejemplo 8, y dió lugar a la cosíntesis de tetraciclina según se indica a continuación:

257216



Contenido en tetraciclina  
por ensayo espectrofotométrico

<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
5 ATCC 13.192 edad 120 horas	0
E-1018 edad 120 horas	0
ATCC 13.192 más E-1018, mezclados a las 48 horas, ensayados a las 120 horas	425

10

EJEMPLO 28

Cosíntesis de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina en una fermentación mixta de S. aureofaciens E-1018 y S. aureofaciens V-15

E-1018, obtenido según se describió en el ejemplo 27, se utilizó en combinación con S. aureofaciens V-15, obtenido según se describió en el ejemplo 22, en un procedimiento de fermentación mixta análogo al descrito en el ejemplo 8. Se obtuvieron los siguientes resultados:

<u>Microorganismos</u>	<u>Contenido en 7-cloro-6-desmetiltetraciclina</u> <u>por ensayo espectrofotométrico</u> <u>mcg/ml</u>
20 E-1018 edad 120 horas	< 10
V-15 edad 120 horas	< 5
E-1018 más V-15 mezclados a 25 las 24 horas, ensayado a las 120 horas	45

EJEMPLO 29

Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de S. aureofaciens V-15 y S. aureofaciens ATCC 12.751

30 El aislado V-15 se preparó de acuerdo con las indicaciones

257216



dadas en el ejemplo 22. Una fermentación mixta de este aislado y S. aureofaciens ATCC 12.751 mediante el método descrito en el ejemplo 8, produjo los resultados indicados a continuación:

5	<u>Microorganismos</u>	Contenido en clorotetraciclina
		por ensayo fluorométrico
		<u>mcg/ml</u>
	V-15 edad 120 horas	20
	ATCC 12.751 edad 120 horas	190
10	V-15 más ATCC 12.751 mezclados a las 24 horas, ensayado a las 120 horas	2700

#### EJEMPLO 30

#### Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de S. aureofaciens ATCC 12.751 y S. albus

15 Una fermentación mixta, realizada según se indicó en el ejemplo 8, y empleando S. aureofaciens ATCC 12.751 y Streptomyces albus dió los resultados siguientes:

20	<u>Microorganismos</u>	Contenido en clorotetraciclina
		por bio-ensayo
		<u>mcg/ml</u>
	ATCC 12.751 edad 120 horas	279
	<u>S. albus</u> edad 120 horas	0
25	ATCC 12.751 más <u>S. albus</u> mezclados a las 24 horas y ensayado a las 120 horas	1390

#### EJEMPLO 31

#### Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de S. aureofaciens ATCC 12.751 y S. platensis NRRL 2364

30 Utilizando los métodos indicados en el ejemplo 10, se realizó una fermentación mixta de S. aureofaciens ATCC 12.751 combinado



con S. platensis NRRL 2364, con los siguientes resultados:

Contenido en clorotetraciclina  
por bio-ensayo

<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
5 ATCC 12.751 edad 120 horas	279
NRRL 2364 edad 120 horas	< 2
ATCC 12.751 más NRRL 2364 mezcla dos a las 24 horas, ensayado a las 120 horas	234
10 ATCC 12.751 más NRRL 2364 mezcla dos y ensayados a las 120 horas	141

EJEMPLO 32

Cosíntesis de clorotetraciclina en una fermentación mixta de  
S. aureofaciens 0-1830 y S. aureofaciens ATCC 13.192

15 Una suspensión de esporas de S. aureofaciens NRRL 2209 se  
expusieron a la radiación ultravioleta mutagénica y, a continua-  
ción, se utilizaron para sembrar ligeramente una placa de agar  
nutritivo AP6. Por incubación se desarrolló una gran variedad  
de tipos de colonias; en total, 109 colonias. Cada una de las co-  
lonias se traspasó a una muestra de agar para producir esporas  
20 que a su vez se utilizaron para inocular medios de fermentación  
en matraces con agitación. Al cabo de 24 horas de incubación, los  
mostos que representan cada colonia original se mezclaron indivi-  
dualmente con porciones iguales de un mosto de 24 horas de S. au-  
25 reofaciens ATCC 13.192. Al cabo de otras 96 horas de incubación,  
cada fermentación mixta se comparó con las fermentaciones del cul-  
tivo de componente puro a las 120 horas. De los productos aisla-  
dos que representan las 109 colonias originales, 87 todavía eran  
30 productores medianamente buenos de clorotetraciclina en un culti-  
vo puro y se desecharon. De las 22 restantes, 20 -que comprendían



257216

colonias más oscuras, más claras, mayores y menores y de colores variables- no presentaron cosíntesis con el S. aureofaciens ATCC 13.192. Uno de los dos productos aislados restantes, designado ahora como O-1830, presentó los siguientes valores:

5	Contenido en clorotetraciclina por ensayo fluorométrico	
	<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
	ATCC 13.192 edad 120 horas	< 2
	O-1830 edad 120 horas	< 2
10	ATCC 13.192 más O-1830 mezclados a las 24 horas y ensayado a las 120 horas	1050

EJEMPLO 33

Cosíntesis de oxitetraciclina en una fermentación mixta de

15 S. aureofaciens ATCC 13.192 y S. rimosus AB115

Una cepa de Streptomyces designada AB115 se aisló de una muestra de suelo tratada según se describió en el ejemplo 24 e identificada como una cepa de S. rimosus. Se realizó una fermentación mixta de ATCC 13.192 y S. rimosus AB115, de acuerdo con los procedimientos descritos en el ejemplo 6 y dió lugar a la cosíntesis sinérgica de la oxitetraciclina según se indica a continuación:

25	Oxitetraciclina	
	<u>Microorganismos</u>	<u>mcg/ml</u>
	ATCC 13.192 edad 120 horas	< 9
	<u>S. rimosus</u> AB115 al cabo de 120 horas	2250
	ATCC 13.192 más <u>S. rimosus</u> AB115 mez clados a las 24 horas, ensayado a las 120 horas	3080
30	ATCC 13.192 más <u>S. rimosus</u> AB115 mez	

257216

24



clados y ensayados a las 120 horas

1180

EJEMPLO 34

Cosíntesis de oxitetraciclina en una fermentación mixta de  
S. rimosus AB115 y S. Aureofaciens E-475

5 Se llevó a cabo una fermentación mixta de S. rimosus  
 AB115 y S. aureofaciens E-475 según se describió en el ejemplo  
 6. Los resultados analíticos se indican a continuación:

	<u>Microorganismos</u>	<u>Ensayo</u> <u>mcg/ml</u>
10	AB115	1800 (oxitetraciclina)
	E-475	1780 (7-cloro-6-desmetil tetraciclina)
	AB115 más E-475 mezclados	{ 3200 (oxitetraciclina)
	a las 24 horas, ensayado	
15	a las 120 horas	tetraciclina)
	AB115 más E-475 mezclados y	{ 900 (oxitetraciclina)
	ensayado a las 120 horas	
		tetraciclina)

20 Esta solicitud que corresponde a la presentada en E.U.A.  
 el 13 de Abril de 1959, bajo el Núm. 805.733, se acoge a los be  
 neficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad  
 Industrial.

25

## N O T A

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

30 1.- Un procedimiento para la producción cosintética sinér

gica de un antibiótico de tetraciclina caracterizado por cultivar por lo menos dos microorganismos del género Streptomyces en un medio nutritivo acuoso que contenga fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas en condiciones aerobias sumergidas, siendo los microorganismos y condiciones de la fermentación tales que produzcan sinérgicamente un antibiótico de tetraciclina deseado en una cantidad mayor de la que produciría cualquiera de ellos solo.

2.- Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el antibiótico de tetraciclina deseado es tetraciclina, clorotetraciclina, bromotetraciclina, oxitetraciclina, 6-desmetiltetraciclina ó 7-cloro-6-desmetiltetraciclina.

3.- Un procedimiento como el reivindicado en las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que los citados microorganismos cuando fermentan individualmente no producen el antibiótico deseado de tetraciclina en cantidades importantes.

4.- Un procedimiento como el reivindicado en las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado por el hecho de que dichos microorganismos cuando fermentan individualmente no producen el antibiótico deseado de tetraciclina en cantidades detectable.

5.- Un procedimiento como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que uno de los microorganismos es de una especie que normalmente produce un antibiótico de tetraciclina.

6.- Un procedimiento como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que cada microorganismo se cultiva separadamente en un medio nutritivo acuoso al principio de un proceso de fermentación.

7.- Un procedimiento como el reivindicado en cualquiera de

257216



las reivindicaciones precedentes, caracterizado por el hecho de que uno o ambos microorganismos son una cepa de S. aureofaciens.

5 8.- Un procedimiento como el reivindicado en las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que un microorganismo es una cepa de S. aureofaciens y el otro es una cepa de S. hygroscopicus.

10 9.- Un procedimiento como el reivindicado en las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que un microorganismo es una cepa de S. aureofaciens y el otro es una cepa de S. rimosus.

10.- Un procedimiento como el reivindicado en las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que un microorganismo es una cepa de S. aureofaciens y el otro es una cepa de S. albus.

15 11.- Un procedimiento como el reivindicado en las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que un microorganismo es una cepa de S. aureofaciens y el otro es una cepa de S. platensis.

20 12.- Un procedimiento como el reivindicado en las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que un microorganismo es una cepa de S. rimosus y el otro es una cepa de S. aureofaciens productora de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina.

13.- Un procedimiento para la producción sinérgica cosintética de un antibiótico de tetraciclina.

25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con



los fines que se han especificado. **257216**

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

Madrid, 24 MAY. 1960

P.A.

5

Alberto de Elzaburo  
Presidente  
*Alberto de Elzaburo*

EPG. *[Signature]*