

282,444

Scherico Limited
Caso 831-X

- 1 -

A₁ 282.444

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

por un procedimiento para la preparación de nuevos antibióticos
en la manera biológica usual, a favor de la firma suiza
SCHERICO LTD., domiciliada en Walkengasse 2, LUCERNE, SUIZA.

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se relaciona con nuevos antibióticos y con métodos para su preparación microbiológica, así como para su concentración, aislación y purificación.

De acuerdo con la presente invención, se suministra nuevos anti-
bióticos mediante la fermentación de ciertas especies del género Micromono-
spora (orden Actinomyetales), a saber Micromonospora purpurea, M. echi-
nospora, y M. halophytica (inclusive sus mutantes y variantes) (el térmi-
no "mutantes", tal como se le utiliza aquí, incluye los mutantes naturales
y artificiales, por ejemplo mutantes producidos a partir de los micro-or-
ganismos descriptos, mediante agentes de mutación tales como radiación de
alta frecuencia (rayos X, radiación ultravioleta), actinófagos y mostazas
nitrogenadas), o de micro-organismos equivalentes, hasta que se hayan for-
mado productos antibióticamente activos, y por aislación de las fracciones
antibióticamente activas con respecto al sustrato así obtenido. Dichas

4001

FD/EM

fracciones pueden separarse adicionalmente, y se puede transformar los antibióticos, así obtenidos, a sus derivados usuales tales como sus sales con ácidos, sus derivados N- y/o O-acilados y sus productos de reacción con compuestos de adición de bisulfito de aldehidos y cetonas.

5. En particular, la presente invención se relaciona con antibióticos básicos y con la preparación de estos últimos a partir de especies de *Micrononospora* apropiadas, mientras que los más importantemente representativos de dichos antibióticos básicos se denominan más adelante "gentamicina" y "antibióticos coproducidos con gentamicina"; además de lo que se denomina más adelante "los antibióticos del grupo R-451" y "los antibióticos del grupo SP-30", y su preparación.

10. Cultivos de los organismos vivientes han sido depositados y constituidos en parte de la colección de cultivo de reserva del United States Department of Agriculture, Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois, de donde se los puede obtener bajo sus respectivas identificaciones NRRL.

Micro-organismos Preferidos

20. De los micro-organismos que se ha comprobado que son útiles para la preparación de gentamicina y sus antibióticos coproducidos, uno de ellos ha sido denominado *Micrononospora purpurea* n.sp., (que en lo que sigue se denomina *M. purpurea*), habiéndosele asignado el número NRRL 2953, y fué originalmente aislado de una muestra de barro de parque en Syracuse, New York. - *M. purpurea* se caracteriza por un fino micelio que tiene término medio un diámetro de 0,5 μ ; no produce un verdadero micelio aéreo; 25. produce esporos simples que tienen un diámetro término medio de 1,0 μ , en

los extremos de esporóforos simples; no es fijo a los ácidos; es gran positivo; digiere ciertos tipos de proteínas y almidón; es aeróbico, creciendo bien entre 22 y 37 °C pero no a 46 °C ó más. Son típicos la forma de colonia y el color anaranjado en la mayoría de los medios de agar orgánicos ricos. En otros medios de agar, de reducido contenido de nitrógeno, el color de la colonia es entre púrpura rojizo y púrpura. Aunque este pigmento púrpura rojizo es característico del recién aislado del suelo, puede perderse temporaria o permanentemente en las cepas que se obtienen mediante repetidas aislaciones y transferencias.

5.

Otra especie, esencialmente equivalente al M. purpurea en la producción de antibióticos, ha sido denominada Micrononospora echinospora n. sp. (que en lo que sigue se denomina M. echinospora). Esta especie fué aislada de una muestra de lodo en Jamesville, Nueva York, habiéndoselo asignado el número NRRL 2985. El M. echinospora, cuando crece en un medio que consiste en 0,05 % de extracto de levadura (Difco), 1 % de dextrosa y 0,1 % de carbonato de calcio en agua destilada e incubado sobre un sacudidor rotativo a 28 °C durante 30 días, se caracteriza por un micelio largo, ramificado, regular y sin tabiques, que tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 μ . El crecimiento es de color púrpura. Son producidos abundantemente

10.

esporos individualmente como ensanchamientos terminales de la punta hifal. Tanto los esporos como los esporóforos tienen característicamente forma de clavos. El esporo maduro es más bien esférico teniendo un diámetro de aproximadamente 1,0 a 1,5 μ . Mediante microscopía de contraste de fase (X 1000) los esporos tienen aspecto de paredes ásperas. Las micrografías electrónicas indican que la aspereza se debe a espinas que sobre-

20.

salen regularmente más allá de la superficie de los esporos, alcanzando ocasionalmente una longitud de 0,2 μ (en este medio de caldo bajo las condiciones mencionadas más arriba, M. purpurea parece no producir esporos). M. echinospora digiere ciertos tipos de proteínas y almidón, es aeróbico y crece también en buenas condiciones en la gema de 22 a 37 °C pero no por encima de aproximadamente 50 °C. Puede producirse un pigmento difusible púrpura cuando crece en un medio que consiste en 0,3 % de extracto de carne de vaca, 0,5 % de triptosa, 0,1 % de dextrosa, 2,4 % de almidón soluble, 0,5 % de extracto de levadura, 0,1 % de carbonato de calcio y 1,5 % de agar, todo ello en agua corriente, sacudiendo a 28 °C durante 30 días. Esta característica de pigmento difusible puede perderse temporariamente en las cepas obtenidas por aislamiento y transferencia repetidas (el M. purpurea, en el medio descrito inmediatamente más arriba, no produce por lo general este pigmento difusible).

Un micro-organismo, que se ha comprobado que es útil para la preparación de los antibióticos del grupo R-451, ha sido denominado Micronospora carbonacea n.sp. (que en lo que sigue se denomina M. carbonacea), habiéndoselo asignado el número NRRL 2972, y fue originalmente aislado de una muestra de suelo obtenida en Olean, Nueva York, U.S.A. El M. carbonacea se caracteriza por el desarrollo de áreas de color negro carbón de acumulación de esporos sobre una colonia micelial vegetativa por lo demás anaranjada cuando crece sobre 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de dextrosa, 0,1 % de CaCO_3 , 1,5 % de agar e incubado durante 20 días a 28 °C. Los esporos de M. carbonacea tienden a ser entre oblongos y elipsoidales y las dimensiones medias del espora maduro es 1,0 X 1,5 μ . Los esporos completa-

mente maduros, cuando se los observa microscópicamente con luz transmitida, son de color oscuro. Aparecen esporóforos en grandes concentraciones en áreas particulares del micelio vegetativo más bien que al azar a través de toda la longitud micelial. El micelio vegetativo normalmente parece no descomponerse en elementos polinórficos (fragmentos), conservando en cambio su integridad hasta autólisis eventual. El micelio vegetativo tiene término medio $0,6 \mu$ de diámetro, no es fijo a los ácidos y es gran positivo. El organismo digiere ciertos tipos de proteínas y almidón, es aeróbico, y crece bien entre 16 y 37 °C, pero no a 50 °C ó más. Aunque la forma de la colonia y el color anaranjado (con notado negro pardusco) son típicos del recién aislado del suelo, las características pueden perderse temporaria o permanentemente en las cepas obtenidas por aislaciones y transferencias repetidas.

Un micro-organismo que se ha comprobado que es útil para la preparación de los antibióticos del grupo SP-30, ha sido denominado Micronospora halophytica n.sp. (que en lo que sigue se denomina M. halophytica), habiéndosele asignado el número NRRL 2998, y fué originalmente aislado de un lodo del fondo de un charco salino en Siracusa, Nueva York. El M. halophytica se caracteriza por un largo micelio ramificado que tiene un diámetro de aproximadamente $0,5 \mu$ y abundante esporulación. Los esporos son entre elipsoidales y esféricos y tienen como término medio $1,2 \mu$ en el diámetro mayor. En los cultivos más antiguos, aparecen con paredes lisas y de color oscuro. Los esporos resultan nacer al azar a lo largo de la longitud micelial sobre esporóforos cortos o largos; ocasionalmente son sesilos. El micelio vegetativo no se descompone normalmente en elementos polinórfi-

ces, resultando conservar su integridad. El micelio no es fijo a los des-
dos y es gran positivo.

5. Para aislar los micro-organismos, se sacude una porción de la
muestra de suelo o de barro secado, respectivamente, en agua destilada es-
téril y, luego de producir apropiadas diluciones, se dispone la suspensión
sobre un medio de agar. El medio deberá contener convenientemente 1 % de
glicerol, 0,2 % de nitrato de sodio, 0,1 % de fosfato dipotásico, 0,05 %
de sulfato de magnesio, 0,05 % de cloruro de potasio, 0,001% de sulfato
ferroso, y 1,5 % de agar; contiene de preferencia 0,5 % de triptosa, 2,0 %
10. de almidón soluble, 0,3 % de propionato de calcio y 2,0 % de agar, todo e-
llo en agua destilada.

Se ensaya los cultivos con respecto a su actividad antibiótica,
haciéndolos crecer primeramente en el siguiente medio durante hasta 60 días
a 26 °C: 0,3 % de extracto de carne de vaca, 0,5 % de triptosa, 0,1 % de
15. dextrosa, 2,4 % de almidón soluble, 0,5 % de extracto de levadura, y 1,5 %
de agar, todo ello en agua corriente. Se extrae entonces el agar acuoso
completo con butanol y se concentra el extracto butanol-agua. Se extrae
suficiente antibiótico, mediante la mezcla butanol-agua, para proveer un
concentrado que, mediante el ensayo con disco, inhibe el crecimiento de
20. Staphylococcus aureus y Bacillus subtilis, y en ciertos casos también de
Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae y Kyoc-
bacterium sporangia. Se observa la actividad antibiótica contra los mismos
organismos después de crecimiento en una fermentación sumergida durante
96 horas en un medio acuoso que contiene sustancias nutritivas apropiadas,
25. como en el caso de M. purpurea y M. chinensis; ya sea uno que contiene

1 % de extracto de levadura, 1 % de caseína y 0,1 % de carbonato de calcio, o uno que contiene los componentes descritos más arriba en este párrafo; en el caso de *M. carbonacea*: uno que contiene 0,5 % de extracto de levadura, 0,1 % de solubles de pescado, 0,1 % de carbonato de calcio, 0,1 % de licor de maceración de maíz, secado por resiado, y 3,0 % de lactosa; y, en el caso de *M. halophytica*, uno que contiene 1 % de amina NZ tipo A (una peptona que resulta de la digestión pancreática de caseína, que puede obtenerse de Sheffield Chemical Co., Norwich, Nueva York) y 5 % de almidón soluble (denominación comercial Difco, Difco Laboratories, Inc., Detroit, Michigan).

Las Tablas I a V comparan las nuevas especies mencionadas más arriba con ciertas especies conocidas de *Micromonospora*. Cuando aparecen rayas, los datos faltan o no han sido incluidos en las tablas.

Las observaciones de colonias de la Tabla I se efectúan después de 14 días de incubación entre 24 y 26 °C en los medios indicados. Al describir las formaciones de color, se emplea el siguiente sistema y referencias: la primera indicación es un nombre de color tomado de "Descriptive Color Name Dictionary", por Taylor, Knoche y Granville, publicado por Container Corporation of America, 1950, con un número de color que corresponde al nombre de color que se toma del "Color Harmony Manual", 4ª Edición, 1938, también publicado por Container Corporation of America; la segunda designación consiste en un nombre y número de color de similar significado que se encuentra en National Bureau of Standards (U.S.A.) Circular 253, Noviembre 1, 1955.

En lo que se refiere a *M. halophytica*, que no aparece en la Ta-

5. bla I, se caracteriza por buen crecimiento dentro de la gama de pH de 6,8 a 7,8. Sus colonias sobre numerosos medios de agar natural son inicialmente anaranjadas pero toman cierto tono de color castaño con la edad (20 días); el castaño claro (canela), castaño anaranjado y castaño, son variantes comunes de color. La colonia raramente toma color castaño oscuro y nunca negro. Dichos micro-organismos muestran abundante esporulación, particularmente en las colonias más antiguas de color castaño. Por lo general se produce un pigmento difusible de color castaño rojizo, sobre un agar compuesto de 0,5 % de extracto de levadura y 1 % de cualquiera de los siguientes azúcares: galactosa, lactosa, levulosa, mannososa, rafinosa y trehalosa.

TABLA I

Taxonomía Comparativa de Especies Micromonospora

15. Parte A: El medio contiene 0,1 % de Amina NZ Tipo A, 1 % de dextrosa, 1,5 % de agar

Organismo	Observaciones	
	Macroscópicas	Microscópicas
20. <u>M. purpurea</u> NRRL 2953	No hay micelio aéreo; colonia levemente levantada, alomada, cerosa; crecimiento regular; no se producen pigmentos difusibles. Color: Superficie: <u>v</u> no oscuro g7PI, castaño rojizo oscuro 44; Reverso: vino g7PC, rojo oscuro 16.	Micelio largo, ramificado, regular, no tabicado, diámetro 0,5 μ ; pocos esporóforos y esporos presentes, esporos de 1,0 μ de diámetro.
25. <u>M. carbonacea</u> NRRL 2972	No hay micelio aéreo; colonia plana húmeda; crecimiento regular; no se produce pigmento difusible. Color: Superficie: periferia anaranjado brillante g4NA, anaranjado vivo 48, centro negro-castaño; Reverso periferia anaranjado brillante g4NA, anaranjado vivo 48, centro negro-castaño.	Micelio largo, ramificado, regular, no tabicado, diámetro 0,6 μ , color oscuro; esporos abundantes, oblongos a elipsoidales, 1,0 X 1,5 μ , nacen en racimos de esporóforos.

5. **M. shalesii**
ATCC 12452

No hay micelio aéreo; colonia levemente levantada, almada, cerosa; crecimiento regular; no se produce pigmento difusible. Color: Superficie: café g3PN, castaño oliva oscuro 96
Reverso: café g3PN, castaño oliva oscuro 96

Micelio largo, ramificado regular, no tabicado, muy fino; diámetro menor de 0,5 μ ; esporos abundantes, esféricos a elipsoidales, castaños, diámetro 1,0 μ ; esporos libres en su mayoría, pero se ven algunas unidas individualmente a esporóforos largos.

10. **M. fusca**
NRRL B-943

No hay micelio aéreo; colonia levemente levantada, hmeda, granulada a almada; crecimiento regular; se produce pigmento difusible castaño amarillento muy leve. Color: Superficie: anaranjado bernejo g4PC, anaranjado oscuro 51
Reverso: canela sucia g4NE, castaño fuerte 55.

Micelio corto, irregular, que produce muchos elementos poliméricos, diámetro 0,8-2,0 μ ; esporos de 1,0 μ de diámetro difíciles de encontrar entre las meras formas poliméricas de pared oscura (castaño oliva).

15. **M. sp.**
ATCC 10026

No hay micelio aéreo; colonia levemente levantada, seca, granulada a almada; no se produce pigmento difusible. Color: Superficie: periferia café g3PN, castaño oliva oscuro 96, centro anaranjado bernejo g4GP, anaranjado oscuro 51; Reverso: periferia café g3PN, castaño oliva oscuro 96, centro anaranjado bernejo g4PC, anaranjado 51.

Micelio largo, ramificado regular, no tabicado, diámetro 0,5 μ ; esporos muy abundantes, en racimos y nacidos individualmente, diámetro 1,0 μ , algunas formas poliméricas presentes, tanto esporos como formas poliméricas de pared oscura.

Parte B: El medio contiene 1% de Amina N2 Tipo A, 1% de extracto, 1.2%

de agar

20. **M. purpurea**
NRRL 2953

No hay micelio aéreo; colonia levantada, convoluta, cerosa; abundante crecimiento; no se forma pigmento difusible. Color: Superficie: terracota g5PE, castaño 55; Reverso: bernejo 55, castaño fuerte 55.

Micelio largo, ramificado regular, no tabicado, diámetro 0,5 μ ; esporóforos simples, esporos nacidos terminalmente, esféricos a elipsoidales, diámetro 1,0 μ .

5. M. chinensis
NRRL 2985
- No hay micelio aéreo; colonia levantada, dentada-convoluta, cerosa; buen crecimiento; pigmento ambar difusible escaso. Color: Superficie: Castaño 32; Jise profundo 61/PL, castaño rojizo oscuro 44; Reverse: bermejo 5PG, castaño fuerte 53.
- Micelio largo, ramificado regular, no tabicado, diámetro 0,5 u; no hay esporas
5. M. Caronesae
NRRL 2972
- No hay micelio aéreo; colonia levantada, almada; crecimiento buano; no se produce pigmento difusible. Color: Superficie: terracota 5PB, castaño fuerte 55; Reverse: terracota 5PB, castaño fuerte 55.
- Micelio largo, ramificado regular, no tabicado diámetro 0,6 u; esporas nacen individualmente sobre esporóforos individuales, oblongos a elipsoidales, 1,0 X 1,5 u, color oscuro.
10. M. Chalcei
ATCC 12452
- No hay micelio aéreo; colonia levantada, almada, cerosa; crecimiento regular; no hay pigmento difusible. Color: Superficie: castaño cobrizo 5PI, castaño fuerte 55; Reverse: castaño bermejo 4PI, castaño fuerte 55.
- Micelio largo, ramificado regular, no tabicado diámetro 0,5 u; esporas abundantes, nacidos individualmente y en racimos, esféricos a elipsoidales, diámetro 1,0 u.
15. M. fusca
NRRL B-943
- No hay micelio aéreo, colonia levantada, granulada áspera, mate; buen crecimiento; muy leve pigmento difusible castaño amarillento. Color: Superficie: terracota 5PB, castaño fuerte 55; Reverse: bermejo 5PG, castaño fuerte 55.
- Micelio irregular, muchos elementos poliméricos presentes, diámetro 0,5 a 2,0 u, color castaño oliva; esporas verdaderas, diámetro 1,0 u, que se gradúan en formas poliméricas de 0,5 a 2,0 u de diámetro.
20. M. sp.
ATCC 10026
- No hay micelio aéreo, colonia levantada, granulada densa, seca; buen crecimiento. Color: Superficie: periferia anaranjada bermeja 4PG, anaranjado fuerte 50, centro castaño chocolate 4PN, castaño grisáceo oscuro 62; Reverse: castaño especia oscuro 4PI, castaño oscuro 59.
- Micelio de dos tipos, uno largo y regular, el otro corto e irregular, que produce muchos elementos poliméricos, diámetro 0,8 a 2,0 u; esporas verdaderas abundantes, nacidos en racimos, diámetro 1,0 u, esféricos a elipsoidales.

25.

En la Tabla II se muestran datos relativos a colonias incubadas durante 14 días a 25°C sobre diversos medios. Los datos de las especies

conocidas, con las cuales se comparan las de la presente invención, han sido tomadas de la obra de Bergoy "Manual of Determinative Bacteriology", 7a. Edición, 1957, publicado por The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland.

5.

TABLA II

	<u>Medio en</u> <u>savado</u>	<u>M. purpurea</u> <u>NRRL 2951</u>	<u>M. carbonacea</u> <u>NRRL 2972</u>	<u>M. halophytica</u> <u>NRRL 2998</u>	<u>M. chlorea</u>
10.	Glucosa	No hay micelio aéreo Crecimiento regular. No hay pigmento soluble. Color: durante brillante g51A anaranjado rojizo modo rudo 37. No se detecta capa de esporos coloreada.	Crecimiento pobre	Crecimiento regular a pobre; colonia plana. Color: anaranjado g4LA, anaranjado fuerte 50.	No hay micelio aéreo. Crecimiento vigoroso. No hay pigmento soluble. Color: cuando pálido a anaranjado profundo, con capa de esporos negra castaña a verdosa.
15.					
	Gelatina	Licuefacción débil (1)	Licuefacción	Licuefacción	Licuefacción débil
	Leche	Rigido lentamente (1)	Lentamente digerido	Digerido	Peptonizado; ocasionalmente coagulado
20.	Sucrosa	Utilizado (1)	Utilizado	Utilizado	Invertido
	Almidón	Hidrolizado (1)	Hidrolizado	Hidrolizado	Hidrolizado
	Celulosa	Atacada en leve medida (1)	-	Descompuesto	Rápidamente descompuesto
25.	Reducción per nitrato	Variable (1)	Nitritos producidos	Nitritos producidos	Se producen nitritos

	Temperatura	Buen crecimiento a 22-37°C, no hay crecimiento a 47°C	Buen crecimiento a 16-37°C, no hay crecimiento a 50°C	Buen crecimiento a 18-40°C, no hay crecimiento a 50°C	Crecimiento óptimo entre 30 y 35°C.
5.	Crecimiento aeróbico o anaeróbico	Aeróbico	Aeróbico	Aeróbico	Aeróbico
	Medio ensayado	<u>M. fusca</u>	<u>M. parva</u>	<u>M. globosa</u>	<u>M. coerulea</u>
10.	Glucosa	Crecimiento vigoroso. Pigmento soluble. Color: anaranjado, cambia a castaño profundo, con capa de esporos negra grisácea a castaña.	Crecimiento pobre	Crecimiento pobre	Crecimiento pobre
15.	Gelatina	Licuaación débil	Licuaación	Licuaación	Licuaación rápida
	Leche	Digerida lentamente; no coagula	Inalterada	Coagulada y peptonizada	Se puede coagular; digestión muy leve
	Sucrosa	Invertida	No invertida	Invertida	Invertida
20.	Almidón	Hidrolizado	Hidrolizado	Hidrolizado	Hidrolizado
	Celulosa	Atacada en leve medida	No se descompone	No se descompone	No se descompone
	Reducción nitrato	Variable	No hay reducción	Nitritos producidos	No hay reducción
25.	Temperatura	-	-	-	-
	Crecimiento aeróbico o anaeróbico	Aeróbico	Aeróbico	Aeróbico	Aeróbico

1) Las propiedades de M. echinospora son idénticas con respecto a estos medios.

En las Tablas III-A y III-B, se compara el crecimiento y color de la colonia de las nuevas especies de la presente invención en diversos medios, con los manifestados por tres especies actualmente disponibles de Micromonospora. Los medios utilizados son aquellos comunmente empleados para determinaciones con Streptomyces. El color de la colonia se identifica mediante los dos sistemas utilizados para los datos de la Tabla I. Además de los contenidos de la Tabla III-A, se llevó a cabo una observación de colonia de M. halophytica en glucosa-extracto de levadura-agar de Waksman, con el siguiente resultado: crecimiento bueno; colonia plegada; color rojo ladrillo g5NG, castaño fuerte 55.

TABLA III-A

Medio	<u>M. purpurea</u> NRRL 2953	<u>M. echinospora</u> NRRL 2985	<u>M. carbonacea</u> NRRL 2972
Agar de Bennett	Crecimiento: bueno. Color: terracota m5PE, anaranjado castaño-54.	Crecimiento: bueno. Color: castaño pro fondo g 71/2PL, castaño rojizo grisáceo oscuro-47.	Crecimiento: bueno; colonia levantada y alomada. Color: anaranjado brillante g5NA, anaranjado vivo 48 (negro castaño moteado) (1).
Agar de Emerson	Crecimiento: bueno. Color: anaranjado tostado g5NC, anaranjado rojizo fuerte 35.	Crecimiento: bueno. Color: rojo teja g5NE, castaño fuerte 55.	Crecimiento: regular; colonia levantada. Color: terracota g5PE, castaño fuerte 55. (1)
Pasta de tomate-harina de avena-agar	Crecimiento: bueno. Color: anaranjado tostado g5NC, anaranjado rojizo fuerte 35.	Crecimiento: regular. Color: anaranjado empolvado g4LC, anaranjado moderado 53.	Crecimiento: bueno; colonia alomada. Color: anaranjado en la periferia g5LA, anaranjado fuerte 50, centro negro castaño. (1)

Glucosa-Asparagina-agar Crecimiento: regular. Color: durazno brillante g5IA, anaranjado rojizo moderado 37. Crecimiento: pobre. Crecimiento: pobre.

Glucosa-Extracto de levadura-agar Crecimiento: bueno. Color: castaño profundo g5PL, castaño oscuro 59 Crecimiento: bueno; colonia granular almenada. Color: arce g4LE, castaño claro 57. Crecimiento: regular; colonia alomada. Color: anaranjado bermelajo g4NC, anaranjado profundo 51.

Medio	<u>M. halophytica</u> NRRL 2998	<u>M. chalcon</u> ATCC 12452	<u>M. fusca</u> NRRL B-943	<u>M. sp.</u> ATCC 10026
10. Agar de Bennett	Crecimiento: regular; colonia plegada, convolutada. Color: cobre g5LC, anaranjado castaño 54.	Crecimiento: bueno. Color: terracota en la periferia g5PE, castaño fuerte 55m, centro: castaño chocolate g4PN, castaño oscuro 59.	Crecimiento: bueno. Color: terracota g5PE, castaño fuerte 55.	Crecimiento: bueno. Color: terracota en la periferia g5PE, castaño fuerte 55, centro: castaño especia 3PL, castaño amarillento oscuro 78.
15. Agar de Emerson	Crecimiento: bueno; colonia mas plegada. Color: cobre g5LC, anaranjado castaño 54.	Crecimiento: bueno. Color: dulcamara g5PC, anaranjado profundo 51.	Crecimiento: bueno. Color: tangerino g5PA, anaranjado vivo.	Crecimiento: bueno. Color: castaño avena g4PL, castaño fuerte 55.
20. Pasta de tomate-harina de avena-agar	Crecimiento: bueno, colonia plegada. Color: terracota en la periferia g5PE, castaño fuerte 55, centro castaño claro g4NC, castaño fuerte 55.	Crecimiento: bueno. Color: terracota en la periferia g5PE, castaño fuerte 55, centro: castaño chocolate 4PN, castaño oscuro 59.	Crecimiento: regular. Color: durazno brillante g5IA, anaranjado rojizo moderado 37.	Crecimiento: regular. Color: durazno brillante g5IA, anaranjado rojizo moderado 37.
25.	(1)			

5. Glucosa-asparagina-agar
 Crecimiento: regular a pobre; colonia plana. Color: anaranjado g4LA, anaranjado fuerte 50.
 Crecimiento: bueno. Color: terracota g5PE, castaño fuerte 55.
 Crecimiento: regular. Color: anaranjado solar g5LA, anaranjado fuerte 50.
 Crecimiento: pobre.

10. Glucosa-extracto de levadura-agar
 Crecimiento: bueno; colonia plegada. Color: castaño especia claro g4LG, castaño moderado 58.
 Crecimiento: bueno. Color: castaño profundo g4PL, castaño oscuro 59.
 Crecimiento: bueno. Color: terracota g5PE, castaño fuerte 55.
 Crecimiento: bueno. Color: castaño avena g4PI, castaño fuerte 55.

1) 0,1 % de CaCO₃ agregado al medio.

TABLA III-B

Medio	<u>M. purpurea</u> NRRL 2953	<u>M. carbonacea</u> NRRL 2972	<u>M. halophytica</u> NRRL 2998
15. Rodaja de patata	Crecimiento: pobre.	Crecimiento: regular.	Crecimiento: pobre.
Rodaja de zanahoria	Crecimiento: pobre.	Crecimiento: pobre.	Crecimiento: pobre.
20. Agar de sucrosa-nitrato (agar de Czapek)	Crecimiento: pobre.	Sin crecimiento.	Crecimiento: regular a pobre (plana). Color: castaño avena g4PI, castaño fuerte 55.
25. Agar de tirosina (observaciones a los 2, 7 y 14 días; según Gordon & Smith, J. Bact. 69: 147)	Crecimiento: regular. Color: pigmento no difusible.	Crecimiento: regular. Color: pigmento no difusible.	Crecimiento: regular, (levemente levantada y alomada). Color: sin reacción.

5.	Agar de peptona-hierro (observaciones a los 2, 7 y 14 días)	Crecimiento: bueno. Color: sin reacción.	Crecimiento: regular. Color: sin reacción.	Crecimiento: regular. Color: sin reacción.
	Púrpura bromocresol-leche	Crecimiento: bueno. Digestión. Color: sin cambio pH.	Crecimiento: regular. Digestión parcial.	
	<u>Medio</u>	<u>M. chalcea</u> ATCC 12452	<u>M. fusca</u> NRRL B-943	<u>M. sp.</u> ATCC 10026
10.	Rodaja de patata	Crecimiento: bueno. Color: rojo pajizo g6PG, castaño rojizo moderado 43.	Crecimiento: bueno. Color: dulcamara g5PC, anaranjado profundo 51.	Crecimiento bueno. Color: dulcamara g5PC, anaranjado profundo 51.
15.	Rodaja de zanahoria	Crecimiento: bueno. Color: castaño chocolate g4PN, castaño oscuro 59.	Crecimiento: pobre.	Crecimiento: regular. Color: anaranjado tostado g5NC, anaranjado rojizo fuerte: 35.
	Agar de sucrosa-nitrato (agar de Czapek)	Sin crecimiento.	Sin crecimiento.	Sin crecimiento.
20.	Agar de tirosina (observaciones a los 2, 7 y 14 días; según Gordon & Smith, J. Bact. 69: 147)	Crecimiento: bueno. Color: pigmento difusible negro.	Crecimiento: regular. Color: pigmento no difusible.	Crecimiento: pobre. Color: pigmento no difusible.
25.				

Agar de peptona-hierro (observaciones a los 2, 7 y 14 días)

Crecimiento: bueno. Color: sin reacción.

Crecimiento: regular. Color: sin reacción.

Crecimiento: regular. Color: sin reacción.

5.

Púrpura bromocresol-leche

Crecimiento: bueno. Digestión. Color: sin cambio pH.

Crecimiento: regular. Digestión. Color: sin cambio pH.

Crecimiento: bueno. Digestión. Color: sin cambio pH.

Los micro-organismos de la presente invención son capaces de utilizar diversas fuentes de carbono y nitrógeno.

10.

En la Tabla IV, se compara su utilización de carbono con la de ciertas especies conocidas de *Micromonospora* mediante una estimación visual del crecimiento sobre placas de agar en medios que consistan en 0,5 % de extracto de levadura Difco (un producto de Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan), 1,5 % de agar y 1 % del respectivo carbohidrato de ensayo, todo ello en agua destilada.

15.

TABLA IV

Carbohidrato de ensayo usado	M. purpurea NRRL 2953	M. echinospora NRRL 2985	M. carbonacea NRRL 2972	M. halophytica NRRL 2998	M. chalcone ATCC 12452	M. fugosa NRRL B-943	M. sp. ATCC 10026
Arabinosa	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno
Celulosa	pobre	pobre	-	pobre	pobre	pobre	pobre
Glucosa	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno
Galactosa	regular	regular	bueno	bueno	bueno	bueno	regular
Lactosa	pobre	pobre	bueno	bueno	regular	pobre	pobre
Levulosa	pobre	pobre	bueno	bueno	regular	pobre	pobre

20.

25.

Mannosa	regu- lar	regular	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno
Rafinosa	pobre	pobre	pobre	crece hasta cierto grado	pobre	pobre	pobre
Ramnosa	pobre	bueno	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre
Almidón	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno
Sucrosa	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno
Xilosa	bueno	bueno	bueno	bueno	bueno	pobre	pobre
Inositol	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre
Mannitol	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre	bueno	bueno
Sorbitol	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre
Testigo 0,5 % ex- tracto de levadura	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre	pobre

Además de los contenidos de la Tabla IV, se determina la utilización del carbono del *M. halophytica* en igual manera, con los siguientes componentes carbohidrato: melibiosa, trehalosa, adonitol, dulcitol y ribosa; con las dos primeras de ollas, se observa buen crecimiento pero un crecimiento solamente pobre con las tres últimas.

En la Tabla V, se compara la utilización de nitrógeno de los micro-organismos de la presente invención con la de otras especies de Microspora por estimación visual del crecimiento sobre placas de agar en un medio que consiste en 1 % de glucosa, 1,5 % de agar y la fuente particular de nitrógeno utilizada (su concentración como la indicada), todo ello en agua destilada. La clave de color usada en la Tabla V está de acuerdo con

le indicado para En Tabla I.

TABLA V

	<u>Fuente de nitrógeno</u>	<u>M. purpurea (1)</u> <u>NRRL 2951</u>	<u>M. carbonacea</u> <u>NRRL 2972</u>	<u>M. halophytica</u> <u>NRRL 2998</u>
9.	0,5 % de extracto de levadura Difco	Crecimiento: bueno. Color: rojo teja g5NE, castaño fuerte 55.	Crecimiento: regular, colonia levantada y alonada. Color: anaranjado en la periferia g5LA, anaranjado fuerte 50, centro: castaño moteado-negro.	Crecimiento: bueno; plegada. Color: castaño oscuro claro g4IG, castaño moteado 30.
10.	1,0 % de amina NE Tipo A	Crecimiento: bueno. Color: borroso g7JFL, castaño rojizo grisáceo oscuro 47.	Crecimiento: regular, colonia levantada y alonada. Color: anaranjado borroso g4PG, anaranjado profundo 51 (levemente moteado negro castaño).	Crecimiento: regular, colonia levantada y alonada. Color: anaranjado tostado g5HC, anaranjado rojizo fuerte 35.
15.	1 % de asparagina	Crecimiento: regular. Color: borroso g7JPL, castaño rojizo grisáceo oscuro 47.	Crecimiento: pobre.	Crecimiento: pobre.
	1 % de ácido glutámico	Crecimiento: regular. Color: borroso g7JPL, castaño rojizo grisáceo oscuro 47.	Crecimiento: pobre.	Crecimiento: pobre.
20.	1 % de nitrato de sodio	Pobre a sin crecimiento.	Sin crecimiento	Crecimiento: pobre.
	1 % de nitrato de amonio	Pobre a sin crecimiento.	Sin crecimiento	Crecimiento: pobre.

Fuente de nitrógeno	<u>M. chalcon</u> <u>ATCC 12452</u>	<u>M. lutea</u> <u>NRRL 1-213</u>	<u>M. sp.</u> <u>ATCC 10026</u>
5. 0,5 % de extracto de levadura Difco	Crecimiento: bueno. Color: rojo pajizo g6PG, castaño rojizo moderado 43.	Crecimiento: bueno. Color: anaranjado bermejo g4PG, anaranjado fuerte 30.	Crecimiento: bueno. Color: dulceamar g5PG, anaranjado profundo 51.
1,0 % de amina N2 Tipo A	Crecimiento: bueno. Color: alheña g5PG, castaño fuerte 55.	Crecimiento: bueno. Color: alheña g5PG, castaño fuerte 55.	Crecimiento: bueno. Color: terracota g5PG, castaño fuerte 55.
10. 1 % de asparagina	Crecimiento: regular. Color: castaño de especia g1PL, castaño amarillento oscuro 78.	Crecimiento: pobre	Crecimiento: pobre.
1 % de ácido glutámico	Crecimiento: regular. Color: castaño de especia g1PL, castaño amarillento oscuro 78.	Crecimiento: pobre	Crecimiento: pobre.
15. 1 % de nitrato de sodio	Sin crecimiento.	Sin crecimiento.	Sin crecimiento.
1 % de nitrato de amonio	Sin crecimiento.	Sin crecimiento.	Sin crecimiento.

1) Los datos para M. schinogera son idénticos a estos.

20. Se ha mencionado más arriba que se considera comprendido dentro del concepto inventivo de la presente invención, el uso de mutantes de las nuevas especies de la presente invención para la producción de antibióticos, como así también el uso de sus variantes. Ejemplos específicos de estas variantes, que difieren de las especies descritas en detalles mentres tales como propiedades morfológicas o bioquímicas, son las siguientes:

25. dos variantes de M. schinogera, denominadas M. schinogera var. ferruginea

5. y M. echinospora var. pallida; y una variante de M. carbonacea, que se denomina M. carbonacea var. aurantiaca. Cultivos de ellos han sido también depositados y forman parte de la colección de cultivos de reserva del United States Department of Agriculture, Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois, donde se encuentran disponibles bajo sus respectivas identificaciones NRRL, a saber NRRL 2995, NRRL 2996 y NRRL 2997, respectivamente. Estas variantes fueron también originalmente aisladas a partir de muestras de lodo cerca de Jamesville, New York, y de suelo de Olean, Nueva York, respectivamente, siendo taxonómicamente las mismas que M. echinospora ó M. carbonacea, respectivamente, pero con las siguientes diferencias:

10. M. echinospora var. ferruginea no reduce los nitratos; crece bien sobre ribosa (tanto M. echinospora como M. echinospora var. pallida crecen pobremente sobre estas pentosa); sus colonias tienden a ser rojizas o de color castaño amarillento (volviéndose ocasionalmente de color rojizo a castaño púrpura por envejecimiento), encontrándose ocasionalmente pigmentos de color castaño en el micelio. La esporulación es por lo general pobre, aunque en ciertos medios (por ejemplo pasta de tomates - agar de harina de avona más 0,1 % de carbonato de sodio) en cultivos viejos, se ha encontrado esporos y esporóforos que tienen la característica pared áspera. En este último medio, y sobre agar de Bonnett, el crecimiento es bueno y la colonia es plegada; el color es rojo-caoba g6 1/2 PI, castaño rojizo oscuro 41.

15. M. echinospora var. pallida no alcanza a producir una pigmentación micelial púrpura oscuro sobre medio de agar. Su color de colonia so-

20.

bre la mayoría de los medios de agar varía en una gama desde anaranjado pálido a canela claro ("café con leche"). Sobre agar de Bennett y pasta de tomates - agar de harina de avena más 0,1 % de carbonato de sodio, el crecimiento resulta bueno; la colonia es plegada. El color de la colonia sobre el primer medio es damasco g4GA, anaranjado claro 52 ; en este último medio, la periferia es del color mencionado más arriba mientras que el centro se vuelve negro.

5. M. carbonacea var. aurantiaca no alcanza a reducir nitrato; ocasionalmente produce un pigmento difusible amarillo cuando se le hace crecer en un medio de carbohidrato sobre la base mannososa o xilosa; manifiesta una producción limitada de esporos. El color de la colonia sobre la mayoría de los medios de agar es anaranjado, volviéndose castaño anaranjado por envejecimiento. La superficie anaranjada contiene ocasionalmente pequeñas áreas negras, que consisten casi enteramente de esporos de color oscuro, y están principalmente compuestas de micelio vegetativo. Sobre agar de Bennett, el crecimiento de la variante es bueno; la colonia se levanta; el color de esta última es anaranjado tostado g5NC, anaranjado rojizo fuerte 35. Sobre pasta de tomates - agar de harina de avena, con un contenido de carbonato de sodio de 0,1 %, el crecimiento es regular; la colonia se levanta; el color de esta última es dulcamara g5PC, anaranjado oscuro 51.

10.

Las variantes enumeradas son equivalentes a las especies descritas más arriba para los fines de producir antibióticos en general, y en particular gentamicina o R-451, respectivamente.

15. Formación y Aislación de los Antibióticos

20. Los nuevos micro-organismos descriptos más arriba y los otros mi-

5. cro-organismos contemplados por el concepto general de la presente invención, por los métodos de fermentación esencialmente como se ha descrito más abajo, producen sustancias antibióticas. Después de la fermentación (incubación), se encuentra los productos antibióticos tanto en el micelio como en el caldo; después de la separación del caldo con respecto al micelio, se prefiere utilizar como fuente de productos antibióticos al micelio en el caso de M. purpurea, M. echinospora, y sus variantes; en cambio, se prefiere utilizar el caldo en el caso de M. carbonacea y sus variantes, y M. halophytica. En todos estos casos se obtiene inicialmente mezclas de antibióticos.

10. En particular, de acuerdo con estudios de cromatografía sobre papel, surge que las sustancias antibióticas producidas por M. purpurea y M. echinospora y sus equivalentes, comprenden por lo menos tres componentes. Al componente principal se le asignó el nombre de gentamicina. Los otros componentes que fueron aislados se denominan BA-3 (Fracción A) y BA-3 (Fracción B), respectivamente.

15. Las sustancias antibióticas producidas por M. carbonacea y sus equivalentes, comprenden por lo menos cinco componentes que en lo que sigue se identificarán como R-451A, R-451B, R-451C, R-451D y R-451E, respectivamente, cuya resolución depende del método empleado. En uno de los sistemas de cromatografía por partición, los componentes con regímenes de migración similares a A, B, C y D son aislados como un grupo que es antibiótico e identificado como R-451. R-451D resulta ser uno de los componentes principales de este grupo.

20. Finalmente resulta que las sustancias antibióticas producidas

25.

por M. halophytica y sus equivalentes comprenden por lo menos cuatro componentes. Se identifica el compuesto de sustancias antibióticas producido por M. halophytica mediante la clave SP-30 y cada uno de los cuatro componentes mencionados más arriba con la clave SP-30A, SP-30B, SP-30C y SP-30D.

5. A fin de formar las sustancias antibióticas, se hace crecer los micro-organismos a una temperatura de aproximadamente 25 a 40 °C bajo condiciones aeróbicas sumergidas en un medio nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono y de nitrógeno asimilables. Fuentes apropiadas de carbono son los carbohidratos tales como almidón, dextrina, ciertos azúcares y lo similar. Fuentes apropiadas de nitrógeno son tanto nitrógeno orgánico como inorgánico, de preferencia el primero, tal como harina de soya, peptonas y lo similar.

10. La fermentación se lleva a cabo a un pH comprendido en la gama de aproximadamente 6 a 8; durante aproximadamente 24 a 48 hr en el caso de M. purpurea y M. echinospora, durante aproximadamente 60 a 72 hr en el caso de M. carbonacea, y durante aproximadamente 96 a 120 hr en el caso de M. halophytica. Aproximadamente al término del respectivo período se alcanza la máxima producción de antibiótico. Se separa ahora el micelio con respecto al caldo, y se aísla los antibióticos, resultando que se han enriquecido.

20. Por consiguiente, en el caso de M. purpurea y M. echinospora, puesto que la mayoría de la actividad reside en el micelio, se separa este último por filtración y se descarta el filtrado. Los antibióticos así producidos (que en vista de las condiciones cuantitativas pueden denominarse simplemente "gentamicina cruda"), son separados con respecto al micelio por extracción ácida con ácido mineral a un pH de aproximadamente 2. Se neutra-

25.

5. liza los extractos ácidos hasta un pH de aproximadamente 6 y se los puede hacer pasar ya sea a través de una resina intercambiadora de iones, de preferencia del tipo Amberlite IRC-50, o bien se los precipita por formación de una sal insoluble, por ejemplo heliantato, Reineckate, dodecilbonconsulfonato (Sal Santomerse S). Ejemplos de resinas del tipo Amberlite aquí empleadas, de intercambio tanto aniónico como catiónico, se encuentran en el "Handbook of Chemistry and Physics", 42a Edición, Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio (1960).

10. Cuando se emplea la "técnica con resina", se hace pasar la solución mencionada más arriba de la "gentamicina cruda" (ver más arriba) a pH = 6, a través de la resina intercambiadora iónica y se eluye la gentamicina cruda a partir de la resina mediante ácido sulfúrico diluido. Se hace alcalino el eluato hasta un pH de aproximadamente 10 mediante hidróxido de sodio. Después de agregar acetona, se precipitan sales inorgánicas. Se ajusta el licor sobrenadante a pH = 4,5 y se concentra bajo presión reducida para obtener una solución concentrada de sulfato de gentamicina cruda. Se agrega metanol a esta solución y se precipita el sulfato de gentamicina cruda.

15. Cuando se utiliza el "método de sal insoluble", se trata el extracto micelial neutralizado (pH = 6) por ejemplo con Santomerse S y se separa por filtración las sales así precipitadas. Se lava el precipitado con agua y se disuelve en metanol. Se filtra la solución metanólica y se la hace pasar entonces a través de una resina intercambiadora aniónica, por ejemplo del tipo Amberlite IRA-401. Se concentra el eluato, se ajusta a pH = 4,5 con ácido sulfúrico, lo cual da por resultado una solución con-

20.

centrada, esencialmente de sulfato de gentamicina. Se obtiene dicho sulfato agregando metanol a la solución y separando por filtración la sal precipitada. Se la puede purificar adicionalmente por reprecipitación como una sal insoluble seguido por regeneración.

3. La gentamicina cruda, tal como es aislada mediante la técnica con resina, puede usarse ya sea tal como es, o se la puede dividir adicionalmente en la gentamicina misma y sus antibióticos coproducidos. Si se tiene la intención de preparar solamente gentamicina, esto se llevará preferentemente a cabo mediante precipitación fraccionada de su sal Santomerse S (de dodecilsulfonato de sodio).

10. Si se desea aislar también los componentes antibióticos coproducidos BA-3 (Fracciones A y B), se los separa de preferencia a partir de una solución metanólica concentrada de gentamicina cruda mediante el agregado de acetona (precipitación fraccionada) [Se aprovecha la mayor solubilidad de la gentamicina en acetona-metanol en comparación con BA-3 (Fracción A) y BA-3 (Fracción B)]. Después de lavar con acetona, se seca el precipitado el cual consiste esencialmente en una mezcla de BA-3 (Fracciones A y B). Otro método para aislar dicha mezcla con respecto a la gentamicina es el que aprovecha la mayor solubilidad de las sales de dodecilsulfonato de estos dos componentes, en comparación con la de la respectiva sal de gentamicina. Se precipita la sal de dodecilsulfonato de gentamicina mediante el agregado de una solución de Santomerse S a una solución de gentamicina cruda. Después de filtrar y lavar la torta de filtro (a la cual se puede trabajar para obtener gentamicina purificada o una sal de la misma), se combinan los filtrados que representan una solución de las sales de dodecil-

bencensulfonato de BA-3 (Fracción A) y BA-3 (Fracción B), mientras que se puede aislar dichos componentes a partir de dicha solución.

De la mezcla obtenida de acuerdo con uno de los métodos alternativos precedentes, se puede separar una de otra las Fracción A y Fracción B, por métodos de cromatografía sobre papel.

Tanto en el caso de M. carbomacea como M. halophytica, puesto que la mayoría de la actividad reside en el caldo, se separa por filtración el micelio y se lo descarta. Se separa las sustancias antibióticas con respecto al caldo mediante extracción con solvente según se describe más adelante. La resolución en componentes se efectúa mediante cromatografía por partición, esencialmente como se describe más adelante.

Se aísla primeramente las sustancias antibióticas con respecto al extracto obtenido del caldo por evaporación del solvente a un residuo. Se examina el residuo por cromatografía sobre papel, que sirve como guía para cromatografía por partición. Se opera los cromatogramas sobre papel en diferentes sistemas solventes y se determina valores R_f para los componentes mediante métodos bioautográficos comunes, que comprenden desarrollar y secar un cromatograma sobre papel que luego se superpone a una placa de agar sembrada con Staphylococcus aureus. Después de un tiempo de contacto de 15 min, se retira el papel de la placa a la cual se insuba entonces a 37 °C durante 16 a 20 hr. Las observaciones de la ubicación de las zonas de inhibición permite determinar valores R_f de los componentes antibióticamente activos.

En las Tablas VI y VII se muestran los diversos sistemas solventes utilizados y los valores R_f determinados para los componentes. En ca-

da sistema de la Tabla VI, se emplea solvente descendente; en la Tabla VII se emplea solventes descendentes y ascendentes, tal como se indica.

TABLA VI

Estudios Cromatográficos de Substancias Antibióticas Producidas por Fermentación de M. carbonacea

Sistema solvente	Valor R _F					
	R-451A	R-451B	R-451C	R-451D	R-451E	
I)						
10. Benceno, 10 p.v. (1)	}	0	0,14	0,28	0,64	0,74
Eter de petróleo (30-60 °C)(2)						
2,5 p.v.						
Acetona, 5 p.v.						
Tiempo de revelación 1,5 hr	}					
II)						
15. Tolueno, 20 p.v.	}	D	0,19	0,42	0,61	0,71
n-butanol, 1,5 p.v.						
Agua destilada, 7,0 p.v.						
Eter de petróleo (30-60 °C)(2)						
20. 1,5 p.v.	}					
Tiempo de revelación 4,5 hr	}					
III)						
25. Eter de petróleo (60-90 °C)(2)	}	0	0,08	0,26	0,60	0,82
5 p.v.						
Metanol 8 p.v.						
Acetato de etilo, 5 p.v.						
Agua destilada, 2 p.v.						
Tiempo de revelación 2 hr	}					

1) p.v. = partes por volumen; en los ensayos originales, 1 p.v. = 0,473 lt

2) Estas temperaturas indican gamas de ebullición.

TABLE VII

Estudios Cromatográficos de Substancias Antibióticas producidas por Fermentación de *H. halophyticola*

	<u>Sistema</u>	<u>Valor R_f de los puntos principales</u>
5.	A-descendente	0,0, 0,35, 0,60, 0,72
	B-ascendente	0,02, 0,11, 0,25
	C-ascendente	0,95
	D-ascendente	0,95
	E-ascendente	1,0
10.	F-ascendente	1,0
	G-ascendente	1,0
	H-descendente	0,01, 0,44, 0,65, 0,81

Sistemas:

15. A) Benceno: cloroformo (93:7 por volumen) saturado con formamida
Papel cromatográfico, antes del uso, sumergido en formamida metanólica al 25 %, secado con papel secante y luego al aire durante 5 min para eliminar el metanol.

B) Benceno: metanol (9:1).

20. C) Metanol: agua (80:20) que contiene cloruro de sodio al 3 %, se regula el pH del papel mediante una solución de sulfato de sodio 0,95 N + bisulfato de sodio 0,5 N y se seca antes de revelar.

D) Propanol: ácido acético:agua (50:5:40).

E) Butanol: ácido acético:agua (4:1:5).

F) Propanol: piridina: ácido acético:agua (15:10:3:12).

25. G) Fenol: agua (80 g:20 ml).

H) Cloruro de metileno:tetracloruro de carbono (80:20) saturado con formamida. Se sumerge el papel cromatográfico, antes del uso, en formamida metanólica al 50 %, se seca con papel secante y luego al aire durante 5 min para eliminar el metanol.

5. El valor R_F observado diferencia al SP-30 de todos los antibióticos conocidos, incluyendo oleandomicina, novobiocina, penicilina G y eritromicina.

10. En los siguientes ejemplos se ilustran métodos apropiados para fermentar los micro-organismos preferentemente usados, extractando las sustancias antibióticas del micelio o el caldo, respectivamente, y resolviéndolas en sus componentes principales. En algunos de los ejemplos, se expresa un valor de análisis del antibiótico así producido, en términos de unidades por miligramo como índice de actividad. El análisis se efectúa microbiológicamente mediante una técnica común de análisis por difusión en

15. agar del tipo a disco (en el caso de la gentamicina y sus antibióticos co-producidos, y del grupo de antibióticos SP-30) o del tipo de taza (en el caso de los antibióticos del grupo R-451) [comparar Donald C. Grove y William A. Randell "Assay Methods of Antibiotics - A Laboratory Manual", Nueva York (1955)], usando Staphylococcus aureus (ATCC 6538P) como organismo

20. de ensayo. Se prepara una curva de referencia trazando la respuesta a dosis del antibiótico diluido en regulador fosfato a pH = 8 en un medio que consiste en:

Peptona	0,6 %
Digesto pancreático de caseína	0,4 %
Extracto de levadura	0,3 %

25.

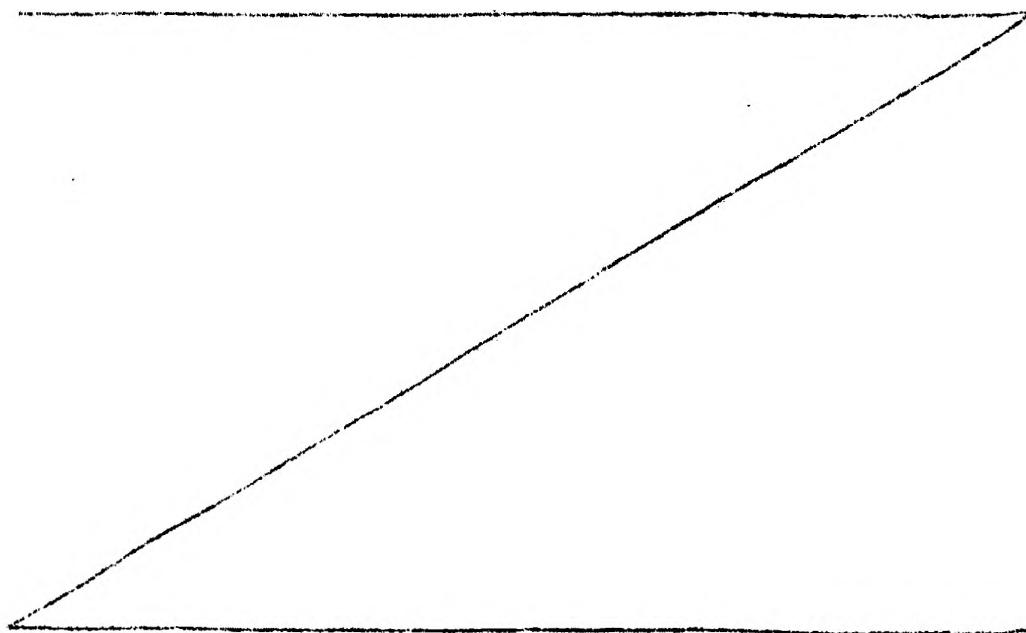
Extracto de carne de vaca	0,15 %
Dextrosa	0,15 %
Agar	0,5 %
pH	6,6

5.

La suspensión utilizada del organismo de ensayo (Staphylococcus aureus) se normaliza de manera de proveer 20 % de transmisión a 660 m μ en un colorímetro. Se determina la potencia de la muestra en base a la curva de referencia y se expresa en términos de unidades por miligramo; una unidad en el "ensayo del tipo a disco" es la cantidad de sustancia de ensa-

10.

yo que se necesita para producir una zona de inhibición de 18 mm con un disco de 13,5 mm, e en el caso del "ensayo del tipo a taza" es la cantidad necesaria para producir una zona de inhibición de 15 mm con un cilindro de acero de un diámetro externo de 6,5 mm.



EJEMPLO I

Preparación de Gentamicina por Fermentación de M. purpurea en Escala de Laboratorio

A) Etapas de germinación

5. Se agrega un cultivo liofilizado de M. Purpurea a un frasco secundario de 300 ml que contiene 100 ml del siguiente medio estéril:

	Extracto de bacto-carne	3 g
	Triptosa	5 g
	Dextrosa	1 g
10.	Almidón soluble	24 g
	Extracto de levadura	5 g
	Agua corriente	1.000 ml (1)

15. 1) En estos y otros datos similares de composiciones a través de esta descripción, se indica a veces el solvente (por lo general agua corriente) en términos de cantidades absolutas, mientras que a veces sigue a la expresión "e.s." Aunque éstas son en realidad dos expresiones diferentes, dentro de la exactitud requerida para estas composiciones se las puede reemplazar una por la otra, si así se desea.

Se incuba el frasco y sus contenidos durante 5 días a 37 °C sobre un secudidor rotativo (200 r.p.m., carrera 5 cm).

20. B) Etapas de fermentación

Se transfiere un inoculum de 25 ml, obtenido de la precedente etapa de germinación, a cada uno de cuatro frascos de 2 lt, cada uno de los cuales contiene 500 ml del siguiente medio:

	Extracto de levadura	10 g
25.	Dextrosa	10 g

Carbonato de calcio	1 g
Agua corriente	1.000 ml

5. Se incuban los frascos y sus contenidos durante 5 días a 26 °C sobre un sacudidor rotativo. Se reúnen los contenidos de los frascos. Se acidifica una alícuota del caldo entero a pH = 2 con ácido sulfúrico 6N y se centrifuga. Se recoge el caldo sobrenadante y se neutraliza con hidróxido de sodio 6N. Se ensaya la alícuota de caldo neutro con respecto a su actividad contra Staphylococcus aureus mediante la técnica de difusión de agar. Los caldos obtenidos en la manera descrita dan por análisis 15 a 20 unidades por mililitro de antibiótico.

10.

C) Aislación de gentamicina cruda (como sulfato) a partir del sustrato de fermentación

15. Se ajusta el pH del caldo entero de la parte B de este ejemplo (aproximadamente 2 lt) a 2 mediante ácido sulfúrico 6N. Se agita y se filtra usando un auxiliar de filtración. Se ajusta el pH del filtrado a 7,0 mediante hidróxido de sodio 6N. Se hace pasar el caldo neutro a través de una columna de resina intercambiadora de cationes (Amberlite IRC-50, 1-10 g de resina por litro de caldo). Se descarta el eluato. Se eluye la columna mediante ácido sulfúrico a pH = 2,0. Se neutraliza el eluato con hidróxido de sodio 6N a pH = 7. Se concentra la solución bajo presión reducida hasta aproximadamente 1/10 de su volumen. Se ajusta a pH = 10,0 mediante hidróxido de sodio 6N (solución) y se agrega 4 volúmenes de acetona mientras se agita. Se enfría la mezcla y se la filtra. Se ajusta el filtrado a pH 5,0 mediante ácido sulfúrico 6N y se concentra bajo presión reducida a la temperatura ambiente hasta que la actividad del concentrado se aproxima

20.

25.

ma a 20,000 unidades por mililitro. Se agrega 10 volúmenes de metanol bajo agitación y se filtra el sulfato de gentamicina precipitado. Se seca bajo presión reducida. Rendimiento total aproximadamente 100 mg, dando por análisis 343 unidades por miligramo por difusión en agar contra Staphylococcus aureus.

5.

D) Purificación de la gentamicina cruda aislada

Se disuelve 15 g de la sal cruda, obtenida en la manera previamente descrita (que da por análisis aproximadamente 340-450 unidades por miligramo) en 50 ml de agua. Se hace pasar a través de una resina intercambiadora de aniones (Amberlite IRA-400, forma OH) en una columna de 38 mm de diámetro y 61 cm de altura. Se lava la columna con 2 lt de agua. Se contra el eluate a sequedad bajo presión reducida y se disuelve el residuo en 50 ml de metanol. Bajo agitación se agrega esta solución a 1 lt de acetona. Se filtra y se lava el precipitado con acetona. Se evapora el filtrado a sequedad y se retoma en 50 ml de metanol. Se agrega esta solución a 500 ml de éter bajo agitación. Se filtra y se lava el precipitado con éter. Se evapora el filtrado hasta un residuo que consiste en gentamicina purificada, aproximadamente 3 g, análisis 961 unidades por miligramo.

10.

15.

EJEMPLO II

Preparación de BA-3 (mezcla de Fracciones A y B) a escala de laboratorio

Se sigue el Ejemplo I (partes A a C). Siguiendo entonces la parte D del Ejemplo I, el agregado de acetona a la solución metanólica del eluate concentrado produce la precipitación de BA-3 (mezcla de las Fracciones A y B). Después de lavar con acetona y secar, el precipitado es suficientemente puro para el uso.

20.

25.

EJEMPLO III

Preparación de Gentamicina y BA-1 (Fracciones A y B) por Fermentación de M. achinospora o sus Variantes en Escala de Laboratorio

5. Reemplazando el cultivo licofilizado de M. purpurea usado en el Ejemplo I (parte A), con un correspondiente cultivo de M. achinospora (o de una de las variantes M. achinospora var. ferruginea y M. achinospora var. pallida), y siguiendo esencialmente el procedimiento de los Ejemplos I y/o II, se podrá obtener de manera similar gentamicina y/o BA-3 (Fracciones A y B), respectivamente.
- 10.

EJEMPLO IV

Preparación de Gentamicina por Fermentación de M. purpurea en Escala Técnica

15. A) Etapas de germinación
- Se lleva a cabo la germinación en la manera descrita en el Ejemplo I (parte A).
- B) Etapas de preparación del inoculum
20. Se transfiere 25 ml del primer inoculum, obtenido de la etapa previa de germinación, a cada uno de cuatro frascos de 2 lt, cada uno de los cuales contiene 500 ml del medio estéril utilizado para la germinación. Se incuban los frascos y sus contenidos durante 5 días a 28 °C sobre un sacudidor rotativo (260 r.p.m., carrera 5 cm). Se reúnen los contenidos de los frascos. Se agrega 25 ml del segundo inoculum así obtenido, a cada uno de veinte frascos de 2 lt, cada uno de los cuales contiene 500 ml del siguiente medio:
- 25.

Harina de soya

30 g

Dextrosa (ceroleosa)	40 g
Carbonato de calcio	1 g
Agua corriente	1.000 ml

Se incuba los frascos y sus contenidos durante 3 a 5 días a 28 °C sobre un sacudidor rotativo (280 r.p.m., carrera 5 cm). Se reúne y se transfiere asépticamente el caldo a un frasco estéril de inoculum que tiene un brazo lateral (volumen total: aproximadamente 10 lt).

5. C) Etapa de fermentación en tanque

Se transfiere asépticamente los 10 lt de inoculum a un fermentador de 240 lt que contiene aproximadamente 185 lt del siguiente medio estéril:

10.

Extracto de bacto-carne	600 g
Bacto-triptosa	1.000 g
Dextrosa (ceroleosa)	200 g
Almidón soluble	4.800 g
Extracto de levadura	1.000 g
Antiespumante a base de silicona (1)	100 ml
Agua corriente, c.s. para	200 lt

25.

1) Se utilizó el producto comercial "Anti-foamer GE 60" de General Electric Co., aunque son también apropiados otros antiespumantes.

Se ajusta el pH a 6,9-7,0 antes de la esterilización. Se fermenta aeróbicamente durante 20 a 30 hr (hasta que el volumen celular es aproximadamente 10 a 15 %) bajo las siguientes condiciones:

20.

Temperatura	37	°C
Entrada de aire estéril, aprox.	150	lt/min

25.

Presión, aprox. 0,5 atm. por sobre la presión atmosférica normal

Agitación 180 r.p.m.

9. Se transfirió asépticamente los contenidos del fermentador a un tanque de fermentación de 2.500 lt que contiene aproximadamente 1.665 lt de un medio estéril que tiene la siguiente composición:

Extracto de levadura 17 kg

Dextrosa 17 kg

10. Carbonato de calcio 1,7 kg

Antiespumante 400 ml

Agua, cantidad suficiente para 1.665 lt

Se fermenta a 35 °C bajo agitación a 120 r.p.m. y se introduce aire aproximadamente a 0,5 atm. por sobre la presión atmosférica normal en una cantidad de aproximadamente 425 lt/min, durante 24 a 31 hr.

15. Al término de este período, la potencia de los antibióticos así producidos alcanza una máxima o cresta que permanece substancialmente constante. Durante la fermentación el pH permanece substancialmente constante en la gama de 6,6 a 7,4. El volumen de las células alcanza un valor constante de 2 a 2,5 ml. La potencia del antibiótico así producido es aproximadamente 25 unidades/mlilitro.

20. D) Aislación de gentamicina cruda (como sulfato) a partir de la fermentación del tanque

Se agrega 25 kg de auxiliar de filtración (colito) a 1.850 lt aproximadamente de caldo de fermentación de la parte C de este ejemplo, y se filtra. Se suspende el auxiliar de filtración y el licado adheren-

25.

to en aproximadamente 370 lt de agua, se ajusta el pH a 2 mediante ácido sulfúrico 6N y se agita durante 15 min. Se filtra y se descarta la torta micelial. Se ajusta el pH del filtrado a 7,0 agregando hidróxido de sodio 4N. Se carga el filtrado neutralizado en una columna de adsorción de intercambio catiónico que contiene 18 a 20 lt de Amberlite IRC-50, bajo su forma sodio. Se descarta el eluato, se lava la resina con agua y se eluye con ácido sulfúrico 2N, se reúnen entonces los eluatos ácidos. Se continúa la elución hasta el pH = 5,0 aproximadamente. Se neutraliza los eluidos así reunidos hasta aproximadamente pH = 7,5 mediante hidróxido de sodio 2N. Se concentra hasta aproximadamente 3,7 lt bajo presión reducida a una temperatura inferior a 45 °C. Se lleva el concentrado a pH = 10,5 mediante solución de hidróxido de sodio 2N. Se agrega 5 volúmenes de acetona, se enfría, se filtra las sales precipitadas y se las lava con acetona; se combina entonces el filtrado y los lavados. Se ajusta el pH del filtrado combinado a 4,5 mediante ácido sulfúrico 2N, se concentra bajo presión reducida a menos de 45 °C, hasta 100 ml. Se agrega 1 lt de metanol, se filtra y se descarta el filtrado. Se disuelve el precipitado (sulfato de gentamicina cruda) en suficiente agua (100 ml) para producir una solución al 20 %. Se ajusta el pH a 10,5 mediante hidróxido de sodio 2N y se agrega 5 volúmenes de acetona. Se enfría, se filtra y se descarta las sales precipitadas. Se ajusta el pH del filtrado a 4,5 mediante ácido sulfúrico 2N, y se concentra bajo presión reducida a 50 ml. Se agrega 500 ml de metanol, se filtra y se lava el precipitado con metanol frío. Se seca el sólido bajo presión reducida sobre pentóxido de fósforo, para obtener aproximadamente 20 a 30 g de sulfato de gentamicina cruda (actividad: aproximadamente

te 500 unidades por miligrano), que consiste substancialmente en el sulfato de gentamicina mezclado con los sulfatos de BA-3 (Fracción A) y BA-3 (Fracción B).

E) Método alternativo para la aislación de gentamicina cruda (como sulfato)

5.

10.

15.

20.

25.

Se filtra el caldo de la parte C de este ejemplo y se suspende el micelio en 350 lt de agua. Bajo agitación se agrega ácido sulfúrico 6N para ajustar el pH a 2. Se filtra y se lava el micelio con agua. Se combina el filtrado y los lavados. Se ajusta el pH a 6,5 mediante hidróxido de sodio 4N. Se agrega 2 kg de tierra infusoria como auxiliar de filtración y 750 ml de una solución acuosa al 30 % de Santomorse S (dodocilbencen sulfonato de sodio). Se agita vigorosamente durante 15 min, se filtra y se lava la torta de filtro con agua. Se seca particularmente al aire la torta de filtro y se suspende entonces en 40 lt de metanol. Se agita durante 10 min y se filtra. Se extrae la torta nuevamente con 40 lt de metanol y se combina los extractos metanólicos. Se hace pasar la solución metanólica (aproximadamente 100 lt) a través de una columna de adsorción de intercambio aniónico que contiene 5,0 lt de Amberlite 401 S en metanol (resina en forma hidroxilada). Se lava la columna con 20 lt de metanol. Se combina los eluatos, se concentra bajo presión reducida hasta aproximadamente 10 lt y se filtra. Se ajusta el pH del filtrado a 7,0 mediante ácido sulfúrico 2N, se concentra a 400 ml y se filtra. Se ajusta el pH del filtrado a 4,5 mediante ácido sulfúrico 2N y se agrega 5 a 10 volúmenes de metanol. Se filtra el sulfato de gentamicina cruda así precipitado, se lo lava con metanol y se seca a 40-60 °C bajo presión reducida. El rendimiento

os aproximadamente 56 g (análisis 625 unidades por miligrano).

F) Purificación del sulfato de gentamicina cruda aislado

5. Se disuelve 55 g de sulfato de gentamicina cruda, tal como se lo obtiene de la parte D o E de este ejemplo, en 10 lt de agua, se ajusta el pH a 6,5 mediante hidróxido de sodio 2N y se agrega 300 g de auxiliar de filtración tierra infusoria. Bajo agitación se agrega 250 ml de una solución acuosa al 30 % de Santomerse S. Se filtra, se lava el precipitado con agua y se seca al aire. Se suspende la torta de filtro en 10 lt de metanol, se agita y se filtra. Se repite la extracción metanólica de la torta de filtro y se combina los filtrados. Se hace pasar los filtrados a través de una columna de intercambio aniónico que contiene 5 lt de Amberlite IRA-401 S (forma OH) en metanol, a un régimen de circulación de aproximadamente 500 ml/min. Se lava la columna con 10 lt de metanol y se combina los eluatos. Se concentra los eluatos combinados bajo presión reducida hasta 1 lt y se agrega ácido sulfúrico diluido hasta que está completa la precipitación (de acuerdo con una modificación ventajosa, se agrega el ácido sulfúrico hasta que se alcanza un pH de 4,5 y luego se agrega, bajo agitación, 18 g de carbón pulverizado activado, se continúa agitando durante 15 min, se filtra, se lava la torta de carbón con agua, se combina el filtrado y los lavados y se agrega a 10 volúmenes de metanol). Se filtra el sulfato de gentamicina así formado y se le seca. El rendimiento es aproximadamente 37 g; análisis aproximadamente 780 unidades por miligrano.

G) Preparación de gentamicina a partir del sulfato de gentamicina

25. Se disuelve 10 g de sulfato de gentamicina purificada (de la parte F de este ejemplo) en 1.500 ml de agua y se hace pasar la solución

a través de una columna de intercambio aniónico que contiene 100 ml de Amberlite IRA-400 (forma OH). Se concentra el eluato y se lo liofiliza para obtener aproximadamente 6,7 g de gentamicina que por análisis da un valor de aproximadamente 1.120 unidades por miligramo.

EJEMPLO V

Preparación de BA-3 (mezcla de Fracciones A y B) en escala técnica

Se sigue el Ejemplo IV (partes A a G, y luego D ó E). Se sigue entonces la parte F del Ejemplo IV y se combina el filtrado del precipitado obtenido por agregado de la solución de Santonorse S, con el agua de lavado de la torta de filtro y se hace pasar a través de una columna de una resina de intercambio aniónico recién regenerada (de preferencia Amberlite IRA-401 S, forma OH). Se concentra el eluato hasta 150 ml y se agrega por gotas a 10 volúmenes de acetona bajo agitación, con lo cual se precipitan las sales que, después de separar por filtración, se lavan con acetona y se descartan. Se concentra el filtrado combinado de manera de eliminar la acetona, dando por resultado una solución acuosa de BA-3 (Fracción A) y BA-3 (Fracción B). Se ajusta la solución a pH = 4,0 mediante ácido sulfúrico 2N y se filtra. Se agrega 10 volúmenes de metanol y se filtra el precipitado resultante, se lava con metanol y se seca. El material anexo secado consiste esencialmente en los sulfatos de BA-3 (Fracción A) y BA-3 (Fracción B).

EJEMPLO VI

Preparación de Gentamicina y BA-3 (Fracciones A y B) Mediante Fermentación

de M. Echinospora o sus Variantes en Escala Técnica

Al llevar a cabo la germinación, mencionada en la parte A del

Ejemplo IV, con cultivo liofilizado de M. schinoseri (o de una de las variantes M. schinoseri var. faruginosa y M. schinoseri var. palida) en vez de M. purpurea, y siguiendo luego esencialmente el procedimiento de los Ejemplos IV y/o V, se puede obtener, de manera similar, gentamicina y/o BA-3 (Fracciones A y B), respectivamente.

EJEMPLO VII

Preparación de Clorhidrato de Gentamicina

10. Se disuelve 10 g de sulfato de gentamicina purificado (de la parte F del Ejemplo IV) en 1.500 ml de agua, se adsorbe en la manera descrita en la parte G del Ejemplo IV, y se ajusta el ajuste a pH = 4,5 mediante ácido clorhídrico. Se concentra la solución a sequedad bajo presión reducida. Se disuelve el residuo en 125 ml de metanol y se agrega 750 ml de acetona. Se recoge sobre un filtro el clorhidrato de gentamicina así precipitado, se lava con acetona y se seca bajo presión reducida entre 40 y 60 °C. El rendimiento es aproximadamente 8,9 g; por análisis de aproximadamente 820 unidades por miligramo.

EJEMPLO VIII

Preparación de Halantato de Gentamicina

20. Se disuelve 6,4 g de sulfato de gentamicina cruda (obtenida de acuerdo con ya sea las partes D ó E del Ejemplo IV) en 65 ml de agua. Se agrega una solución caliente (75 °C) de 32 g de Anaranjado Metilo en aproximadamente 300 a 350 ml de agua. Se agita y se calienta la mezcla a 75 °C y se filtra en caliente. Se lava con agua el halantato así precipitado y se seca bajo presión reducida sobre pentóxido de fósforo. Se recristaliza a partir de metanol acuoso caliente, obteniéndose aproximadamente 12,4 g

de agujas de color castaño rojizo, p.f. = 265 °C (dose.).

Análisis: C 52,74 %, H 6,43 %, N 13,61 %, O 19,42 %, S 7,64 %.

5. El holiantato así formado a partir de sulfato de gentamicina cruda puede contener cantidades menores de las respectivas sales de los antibióticos coproducidos BA-3 (Fracción A) y BA-3 (Fracción B). Sin embargo, la preparación del holiantato en la manera descrita más arriba representa una purificación, puesto que, por conversión al clorhidrato (por disolución en ácido clorhídrico 2N; filtración a través de un lecho de carbón; concentración del filtrado; agregado de 6 volúmenes de acetona; y separación del clorhidrato así precipitado por filtración y secado), se puede obtener un producto que tiene un valor, por análisis, de aproximadamente 760 unidades por miligramo.

EJEMPLO IX

Preparación de Reineckato Gentamicina

15. Se disuelve 2,2 g del sulfato de gentamicina cruda (ya sea de las partes D ó E del Ejemplo IV) en 22 ml de agua. Se agrega 82 ml de una solución acuosa saturada de Sal Reineckato, bajo agitación. Se agita la mezcla a la temperatura ambiente durante 1 hr y luego se deja reposar durante la noche aproximadamente a 5 °C. Se filtra el precipitado, se lava con agua enfriada con hielo y se seca bajo presión reducida sobre pontóxido de fósforo. Se recrystaliza la Reineckato a partir de metanol acuoso caliente, obteniendo agujas púrpura, p.f. = 270 °C (dose.).

20. Análisis: C 24,50 %, H 4,49 %, N 22,10 %, S 27,92 %, Cr 9,52 %.

25. La sal Reineckato así obtenida puede contener cantidades menores de las correspondientes sales de antibióticos coproducidos, pero aún se la

5. pueda utilizar como purificación, puesto que, por reconversión al sulfato (disolviendo la heptacate en metanol acuoso; adsorbiendo sobre una resina intercambiadora de aniones fuertemente básica (Amberlite MB-401 S); concentrando el eluate; ajustando el pH a 4,5 mediante ácido sulfúrico diluido; agregando 5 volúmenes de metanol; y filtrando el sulfato de gentamicina purificado así precipitado), se puede obtener un producto que tiene un valor, por análisis de aproximadamente 700 unidades por miligramo.

EJEMPLO X

Preparación de la Sal de Sodio de Ácido Gentamicina-Poli-D-Metileno-sulfato

10. Se disuelven 16,4 g de sulfato de gentamicina (de la parte F del Ejemplo IV) en 108 ml de agua. Se agrega 30 g de formaldehído-bisulfito de sodio en porciones de 100-200 mg. Se agita durante 30 min, se agrega trietilamina hasta que el pH aumenta a 6,8 y se sigue agitando durante 18 hr.
15. Se agrega la mezcla de reacción a 5 volúmenes de metanol, y se enfría a 5 °C. Se filtra y se lava el precipitado con metanol y luego con éter. Se seca al aire. Se obtiene un polvo amorfo incoloro.
20. Se puede obtener en la siguiente manera un producto de más alta calidad. Se disuelve 200 g de sulfato de gentamicina (obtenido de acuerdo con el Ejemplo IV-F) en 1,3 lit de agua. Se agrega 366 g de formaldehído-bisulfito de sodio en pequeñas porciones a través de un período de 20 min. Se ajusta el pH a 6,7 mediante 135 ml de trietilamina y se agita durante 16 hr a la temperatura ambiente. Se agrega la solución a 7,5 lit de metanol bajo agitación. Se filtra el precipitado y se lava con metanol. Se combina
25. el filtrado y los lavados metanólicos y se agrega a 9,8 lit de acetona bajo

agitación. Se filtra el precipitado, se lava con acetona y se seca. El residuo es 178 g de un polvo blanco amorfo; la actividad es 580 unidades por miligramo.

Análisis: C 26,44 %, H 6,18 %, N 5,54 %, S 14,66 %, Na 7,49 %; contenido total de cenizas 22,2 %.

EJEMPLO XI

Preparación de R-451 por Fermentación de *M. carbonacea* a Escala de Laboratorio

A) Etapas de germinación

Se agrega asépticamente un cultivo liofilizado de *M. carbonacea* a un frasco sacudidor de 300 ml que contiene 100 ml del medio descrito en la parte A del Ejemplo I. Se incuba el frasco y sus contenidos durante 4 días a 37 °C sobre un sacudidor rotativo (280 r.p.m./min, carrera 5 cm).

B) Etapas de Fermentación

Se transfiere 25 ml del inoculum obtenido de la etapa precedente de germinación a cada uno de cuatro frascos de 2 lt cada uno de los cuales contiene 500 ml del siguiente medio:

Levadura	5 g
Solubles de pescado	1 g
Licor de maceración de maíz (seco)	1 g
Carbonato de calcio	1 g
Lactosa	30 g
Agua corriente	1.000 ml

Se incuba los frascos y sus contenidos durante 2 a 3 días a 26 °C sobre un sacudidor rotativo. Se reúne los contenidos de los frascos.

C) Extracción de las sustancias antibióticas.

- A los fermentos reunidos de la parte B de este ejemplo, se agrega un auxiliar de filtración (tierra infusoria) y se filtra. Se extrae el filtrado mediante acetato de etilo o cloroformo, se mantiene el pH de la fase acuosa a 7 o más (pero de preferencia lo más próximo posible a pH = 7). Se concentra el extracto hasta un aceite residual por evaporación del solvente bajo presión reducida. Se disuelve el residuo en un exceso de cloroformo y se clarifica por filtración. Se concentra bajo presión reducida la solución cloroformica hasta pequeño volumen y se agrega la solución concentrada, bajo agitación, a 10 volúmenes de éter de petróleo (gama de ebullición 30 a 60 °C). Se separa el precipitado por filtración (puede ser necesario llevar a cabo repetidas precipitaciones a partir de cloroformas si al comienzo se forma un aceite más bien que un material filtrable sólido), conteniendo dicho precipitado la mayoría de las sustancias antibióticas.
5. Este material es activo contra Staphylococcus aureus cuando se ensaya soluciones que contienen una cantidad tan reducida como 10 g/ml, mediante análisis por difusión en disco.

D) Purificación de la sustancia antibiótica cruda obtenida de la parte C. de este ejemplo.

20. En esta etapa se utiliza una purificación por cromatografía en columna sobre alúmina. El eluto principal se define como H-451, y resulta estar desprovisto del componente H-451E. La purificación sobre alúmina ha de ser al H-451 soluble en agua y por lo tanto permite la preparación de formas en dosis acuosas o formas más solubles del antibiótico.
25. Se prepara una columna de adsorción cromatográfica sobre alúmina

que se empaqueta vertiendo una suspensión de alúmina de calidad cromatográfica (producto comercial Nº 71.707 de Merck & Co.) en cloroformo-metanol (3:1) en una columna de vidrio que tiene un diámetro interno de aproximadamente 51 mm, de manera que la altura de la alúmina es aproximadamente 61 cm.

Se disuelve 10 g del material antibiótico crudo, obtenido más arriba, en 50 ml de cloroformo y se agrega lentamente la solución a la columna. Se eluye la columna con cloroformo-metanol(3:1) recogiendo 12 fracciones de 500 ml cada una, y se continúa entonces la elución con metanol-cloroformo (3:1) recogiendo otras 37 fracciones adicionales de 500 ml cada una. Se ensaya las fracciones secando al aire pequeñas muestras y analizándolas con respecto a Staphylococcus aureus. Se reúne fracciones sobre la base de actividad contra Staphylococcus aureus. La porción principal del material sólido y la actividad máxima resultan encontrarse en las fracciones 13 a 30. Se reúne estas fracciones, se las concentra bajo presión reducida y se precipita mediante el agregado a éter de petróleo. Se filtra y se seca al aire el antibiótico precipitado R-451, rendimiento 1,7 g, actividad demostrada por por lo menos 1 µg/ml contra Staphylococcus aureus (ensayo de difusión sobre disco).

En la Tabla VIII, se presenta datos que muestran las fracciones particulares reunidas, la manera de aislar el material antibiótico sólido, con respecto al cuato, los resultados de ensayo en disco con respecto a Staphylococcus aureus y los valores R_f para las fracciones reunidas en el sistema particular empleado. Los valores R_f se calculan en la manera usual siguiendo bioautografía contra Staphylococcus aureus del cromatograma sobre papel desarrollado.

EJEMPLO XII

Preparación de R-451 por Fermentación de M. Carbonacea Var. Aurantiaca a Escala de Laboratorio

3. Reemplazando el cultivo liofilizado de M. carbonacea on la parte A del Ejemplo XI con un correspondiente cultivo de M. carbonacea var. aurantiaca, y siguiendo esencialmente el procedimiento de dicho ejemplo, se podrá obtener de manera similar el R-451.

EJEMPLO XIII

Preparación de R-451 por Fermentación de M. Carbonacea a Escala Técnica

10. A) Etapa de germinación

Se agrega asépticamente un cultivo liofilizado de M. carbonacea a un frasco sacudidor de 300 ml que contiene 100 ml del siguiente medio de crecimiento estéril:

15. Extracto de bacto-carno	3 g
Triptosa	5 g
Dextrosa	1 g
Almidón soluble	24 g
Extracto de levadura	5 g
Carbonato de calcio	1 g
20. Agua corriente	1000 ml

Se incuba el frasco y sus contenidos durante 4 días a 35 °C (o hasta que se obtiene buena germinación) sobre un sacudidor rotativo (280 r.p.m., carrera 5 cm).

25. B) Etapa de pre-siembra

A cada uno de tres frascos sacudidores de 300 ml, cada uno de los

cuales contiene 100 ml del medio de crecimiento estéril mencionado más arriba, se agrega 5 ml del primer inoculum obtenido de la precedente etapa de germinación. Se incuban los frascos y sus contenidos durante 72 hr a 30 °C sobre el sacudidor rotativo.

5. C) Etapa de preparación del inoculum

Se transfieren 25 ml del segundo inoculum, obtenido de la precedente etapa de pro-sombra, a cada uno de diez frascos de 2 lt, cada uno de los cuales contiene 500 ml del medio de crecimiento estéril utilizado para la germinación. Se incuban los frascos y sus contenidos durante 72 hr a 30°C sobre un sacudidor rotativo (280 r.p.m., carrera 5 cm). Se rotan los contenidos de los frascos y se transfieren asépticamente el caldo a un frasco de inoculum estéril que tiene un brazo lateral (volumen total aproximadamente 5 lt).

10. D) Etapa de fermentación en tanque

Se transfieren asépticamente los 5 lt de inoculum a un fermentador de 130 lt que contiene 90 lt del medio de crecimiento estéril empleado en la etapa de germinación. Se fermenta aeróbicamente durante 20 a 30 hr (hasta que el volumen de células compactadas es aproximadamente 20 a 30 %, según se determina centrifugando una muestra de 10 ml a 2800 r.p.m. durante 5 min) bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	35 °C
Entrada de aire estéril, aprox.	153 lt/min
Presión, aprox.	0,5 atm. por sobre presión atmosférica normal
Agitación	180 r.p.m.

25.

Cuando el volumen de las células empaçadas alcanza un nivel de por lo menos 2 ml, se transfiere asépticamente los contenidos del fermentador a un tanque de fermentación de 2500 lt que contiene aproximadamente 1665 lt del siguiente medio estéril:

9.	Extracto de levadura	8,5 kg
	Solublos de pescado	1,7 kg
	Licor de maceración de maíz (soco)	1,7 kg
	Carbonato de calcio	1,7 kg
10.	Lactosa	51,0 kg
	Antiospumante	500 ml
	Agua blanda, aprox.	1665 lt

Se fermenta a 35 °C mientras se agita a 120 r.p.m. y se introduce aire aproximadamente a 0,5 atm. por encima de la presión atmosférica normal en una cantidad de aproximadamente 425 lt/min durante 50 a 70 hr. Al término de este período, la potencia del antibiótico así producido alcanza un máximo que permanece substancialmente constante, según se determina por extracción de muestras y análisis contra Staphylococcus aureus.

20. Durante la fermentación, el pH permanece substancialmente en la gama de 7,0 a 7,3. El volumen de células empaçadas alcanza un valor constante de aproximadamente 2,0 ml.

E) Aislación de las sustancias antibióticas después de fermentación en el tanque

25. Se agrega 25 kg de auxiliar de filtración (Colito) a los 1850 lt, aproximadamente, de caldo de fermentación obtenido de la parte D de este ejemplo, se agita y se filtra. Se descarta la torta micelial. Se extrae

cuando con ya sea las partes E o F de este ejemplo, en 38 ml de la fase más pesada del sistema de solventes en dos fases. Se agrega 19 g de la tierra infusoria a la solución y se agrega la mezcla sólida a la parte superior del lecho de la columna y se comprime firmemente. Se eluye con la fase más liviana del sistema solvente en dos fases.

5.

Se recoge los eluatos a razón de 50 ml/min. La cantidad de fracciones individuales es opcional, pero está relacionada con el volumen que puede contener la columna (HUV) (el HUV se define como el volumen ocupado por la fase más liviana del sistema en dos fases en el volumen del lecho total de la columna). En esta columna, el HUV representa aproximadamente 3500 ml. Se descarta el primer volumen retenido que se ha recogido. Luego se cromatografía una muestra de cada fracción así recogida, sobre papel usando el sistema solvente I (Tabla VI) y se bioautografía el papelograma revelado y secado con respecto a Staphylococcus aureus. Se combina las fracciones de acuerdo con su diagrama cromatográfico sobre papel en grupos que luego se concentran a sequedad bajo presión reducida, se posa los residuos, y se los cromatografía y bioautografía nuevamente sobre papel para determinar la composición relativa del grupo particular de fracciones. De esta manera se obtienen los resultados de la Tabla IX.

10.

15.

TABLA IX

Cromatografía Sobre Tierra Infusoria de los Antibióticos del Grupo R-451

20.

25.

<u>HUV</u>	<u>Eluyente, ml</u>	<u>Peso del residuo, mg</u>	<u>Diagrama bioautográfico sobre papel: R_F</u>
1	3.500	-	-
2	3.500	4.300	0,77

2,1-2,9	2.800	190	0,79
3-10	24.500	2,200	0,3; 0,65; 0,75
11-13	7.000	100	0,14; 0,28; 0,64
14-16	7.000	100	0

5. Se cromatografía 1 g del material, obtenido del HUV 3-10 utilizando el soporte inerte (Chromosorb W) para la fase más pesada del siguiente sistema solvente en dos fases:

Etter de petróleo (gama de ebullición 30-60 °C)	10 partes
Tolueno	200 partes
Alcohol n-butílico	15 partes
Alcohol etílico	15 partes
Agua destilada	70 partes

10. Se equilibra primeramente 600 g del soporte tierra infusoria con 300 ml de la fase más pesada de la precedente mezcla de solventes en dos fases y se vierte lentamente en una columna de vidrio que tiene un diámetro de 5 cm, estando esta columna parcialmente llonada con la fase más liviana del sistema solvente precedente en dos fases. Se permite que el soporte se sedimente por gravedad hasta un lecho compacto y se comprime adicionalmente mediante presión de nitrógeno de aproximadamente 0,07 a 0,15 atmósferas por encima de la presión atmosférica normal. La altura de la columna así preparada es 107 cm, y su volumen de retención es 900 ml.

20. Se disuelve el material, que se desea cromatografiar, en 10 ml de la fase más pesada del precedente sistema solvente en dos fases, se agrega 5 g del soporte inerte y se mezcla. Se agrega la mezcla sólida a la parte superior del lecho de la columna y se presiona firmemente. Se lleva a cabo

25.

5. elución con la fase más liviana del precedente sistema de solvente en dos fases a un régimen de circulación de 100 ml/min. Se recoge continuamente fracciones de 50 a 900 ml (correspondientes a 1/18 a 1 veces el volumen de retención del lecho de la columna). Se descarta el primer volumen de retención que se obtiene inmediatamente después de aplicar el material de ensayo y se inicia la recolección con el segundo volumen de retención.

10. De inmediato se cromatografía una muestra, de cada fracción recogida, sobre papel usando el sistema solvente I (Tabla VI) y se bioautografía el papograma revolado y secado, contra Staphylococcus aureus (se prefiere el sistema I puesto que es el que migra más rápidamente). Se combina las fracciones de acuerdo con su diagrama cromatográfico sobre papel, y se concentra las fracciones, así reunidas, a sequedad bajo presión reducida. Se pesa los residuos y se las recromatografía sobre papel seguido por bioautografía para confirmación de la composición. El resultado de la separación cromatográfica en columna, así tratada, se indica en la Tabla X.

15. TABLA X

Cromatografía de HUV 3-10 de los Antibióticos del Grupo R-451

<u>HUV</u>	<u>Eluyente, ml</u>	<u>Peso del residuo, mg</u>	<u>Diagrama bioautográfico sobre papel: R_F</u>
1	900	-	-
1-1,5	450	320	0,78
1,5-14	11.000	680	0,64; 0,74

20. EJEMPLO XIV

Preparación de R-451 por Fermentación de M. Carbonacea Var. Aurantiaca on

25. Escala Técnica

Se reemplaza el cultivo liofilizado de M. Carbonacea, usado en la parte A del Ejemplo XIII, por un correspondiente cultivo de M. carbonacea var. aurantiaca, mientras que por lo demás se sigue el procedimiento del Ejemplo XIII (partes A a D, E ó F, y G). Se obtiene también el R-451.

EJEMPLO XV

Separación del Componente R-451D con respecto al R-451

Se suspende 100 mg del residuo, obtenido del HUV 1,5 a 14, de acuerdo con la Tabla X (Ejemplo XIII-G), o la correspondiente fracción del Ejemplo XIV, en 40 ml de éter mientras se agita vigorosamente a la temperatura ambiente. Se filtra y se enfría el filtrado durante la noche. Se filtra el precipitado que así se forma y se lo lava con éter enfriado con hielo. Se seca al aire, obteniendo aproximadamente 81 mg de un polvo casi incoloro, que da por análisis 1155 unidades por miligramo, representando R-451D altamente purificado.

El R-451D purificado, así obtenido, cuando se lo analiza cuantitativamente contra Staphylococcus aureus resulta ser biológicamente homogéneo. Cuando se lo cromatografía sobre una delgada capa de gel de sílico, de acuerdo con la técnica de Stahl usando acetona-benceno (1:1) como agente de elución, seguido por tratamiento con ácido sulfúrico de la placa revelada y secada, no se puede detectar otra sustancia que el R-451D.

EJEMPLO XVI

Preparación del Acetato de R-451D

Se disuelve 25 mg del R-451D en 1 ml de piridina. Se agrega 0,4 ml de anhídrido acético y se deja reposar la mezcla durante la noche. Se filtra el precipitado, se lava con agua para eliminar la piridina y el áci-

de acético, se seca sobre pentóxido de fósforo bajo pronunciada presión reducida durante la noche. El rendimiento es 11 mg de un polvo amorfo incoloro, p.f. = 135-136 °C. Se puede aislar una segunda cosecha de material a partir de licor madre del precipitado procedente, enfriándolo durante la noche en un refrigerador (5 °C), filtrando el precipitado, lavándolo de manera de liberarlo de cualquier piridina y anhídrido acético, y secándolo en la manera descripta más arriba. El rendimiento es 6 mg de un polvo amorfo incoloro.

Cuando se cromatografía sobre una capa delgada, usando un gel de sílice (producto comercial "Silikagel G" de E. Merck A.G., Darmstadt) como adsorbente y acetona-benceno (1:1) como sistema eluyente, y después de rociado de la placa revolada y secada mediante ácido sulfúrico, se obtiene un solo componente de valor R_f 0,87 (bajo estas condiciones el R-451D tiene un valor R_f 0,49). Por hidrólisis alcalina en metanol, se regenera el R-451D a partir de acetato de R-451D.

EJEMPLO XVII

Separación del Componente R-451E

Este componente no polar de la mezcla de antibióticos se encuentra por lo general en altas concentraciones en el licor sobrenadante de la precipitación en cloroformo-éter de petróleo que se describe en la parte E del Ejemplo XIII, y en la correspondiente fracción obtenida de acuerdo con el Ejemplo XIV. También está presente, en menor medida, en las sustancias antibióticas precipitadas, siendo recuperable, a partir de las mismas, utilizando el método de cromatografía por partición en columna descripta en la parte G del Ejemplo XIII.

Para obtener el R-451E, se concentra el HUV 1 a 1,5 (Tabla X) a

sequedad bajo presión reducida y se seca al aire. De esta manera se obtiene aproximadamente 320 mg de un material de color ámbar que se purifica adicionalmente por precipitación a partir de éter-hexano, obteniéndose 280 mg de un polvo amorfo casi incoloro que representa al B-451B purificado. Por cromatografía sobre papel en el sistema I (Tabla VI) y bioautografía contra Staphylococcus aureus y Penicillium subtilis, el antibiótico B-451B, así obtenido, resulta ser biológicamente homogéneo.

EJEMPLO XVIII.

Separación de los Componentes B-451B, B-451C, y B-451A

10. A) Primera etapa de separación.

Se inicia la separación de estos componentes con respecto a las sustancias antibióticas crudas mediante una cromatografía por partición similar a la descrita en la parte B del Ejemplo III, utilizando un sistema solvente en dos fases y una tierra inactiva purificada (producto comercial Chromosorb W, Johns Manville and Company, lavada sin ácido, dimensiones de mallas 60-100) como soporte inerte para la fase más pesada, según se indica a continuación.

20. Se prepara primeramente el sistema en dos fases (éter de petróleo, acetato de etilo, metanol, agua) descrito en el Ejemplo XIII (C). Se equilibra 2,5 kg del soporte inerte con 1250 ml de la fase más pesada de la mezcla de solventes en dos fases y se prepara el lecho de la columna en la manera descrita en el Ejemplo XIII (C). El HVV de esta columna es aproximadamente 8000 ml.

25. Se disuelve 7,4 g de la mezcla amorfa del Ejemplo VIII (E), o de la correspondiente fracción obtenida de acuerdo con el Ejemplo XIV, en 40 ml

de la fase más pesada del sistema de solventes en dos fases. Se agrega 20 g de la tierra infusoria y se agrega la mezcla sólida a la parte superior del lecho de la columna y se comprime firmemente. Se eluye con la fase más liviana del sistema solvente en dos fases. Siguiendo el procedimiento de separación cromatográfica en columna descrito en el Ejemplo XIII (C), se obtiene los resultados de la Tabla XI. Se puede observar que los componentes B-451B y B-451C₁ han sido enriquecidos en el grupo de fracción RUV 1,9 a 2,8, mientras que el componente B-451A ha sido enriquecido en el grupo de fracción RUV 4,0 a 5,0.

10.

TABLA XI

Primera Separación de Substancias Antibióticas del Grupo B-451 por Cromatografía sobre Tierra Infusoria

	<u>RUV</u>	<u>Eluyente, ml</u>	<u>Peso del residuo, mg</u>	<u>Microgramas bioautográfico sobre papel: R</u>
15.	0,9	7.000	-	-
	1-1,1	800	186	0,8; 0,55
	1,2-1,8	5.000	900	0,56; 0,43
	1,9-2,8	7.200	5.700	0,16; 0,23; 0,45; 0,55
	2,9-3,9	8.000(1)	100	0; 0,16; 0,23; 0,55 (vestigios)
20.	4,0-5,0	8.000(2)	120	0

1) Elución con acetona.

2) Elución con 50% de acetona en metanol.

B) Separación séptima de los B-451B y B-451C₁

Se cromatografía 1,8 g del residuo obtenido del RUV 1,9 a 2,8

25. de la separación cromatográfica precedente, sobre 1800 g de polvo de colu-

losa (producto comercial Whatman, lavado sin ácido; calidad fina) empaçado en una columna de 7,5 cm de diámetro hasta una altura de 150 cm usando la siguiente mezcla de solventes en una sola fase;

	Acetona	1 parte
5.	Eter de petróleo (gama de ebullición 30 a 60 °C)	25 partes
	Benceno	50 partes

15. Se disuelve el material, que se desea cromatograficar, en 68 ml de la mezcla solvente, se agrega y se mezcla 50 g de celulosa y se carga la mezcla en la parte superior del lecho de la columna. Se lleva a cabo elución a un régimen de circulación de 50 ml/min. Se recoge continuamente fracciones de 100 ml. El HUV de esta columna es aproximadamente 6000 ml. Se combinó los eluatos en la manera ilustrada en la Tabla XII. Después de observar que el componente R-451B ha sido enriquecido en el grupo de fracción HUV 17,7 a 27,7, mientras que el componente R-451C₁ ha sido enriquecido en HUV 1,7 a 17,6.

TABLA XII

Cromatografía de HUV 1,9 a 2,8 de la Tabla XI

	<u>HUV</u>	<u>Eluyente, ml</u>	<u>Peso del residuo, mg</u>	<u>Diagrama bioautográfico sobre papel: R_F</u>
20.	0,7	4.200	-	-
	0,8 - 1,6	4.800	1.100	0,55
	1,7 - 17,6	96.000	300	0,43
	17,7 - 27,7	60.000	200	0,16; 0,23
25.	27,7 - 28,1	2.400	70	0; 0,15

C) Purificación del R-451B

Se disuelve 200 ml del residuo obtenido del HUV 17,7 a 27,7 (Tabla XII) en 5 ml de acetona. Bajo vigorosa agitación se agrega la solución acetónica a 50 ml de Hexano. Se filtra el precipitado así formado y se le lava con hexano. Se seca a la temperatura ambiente bajo presión reducida sobre pentóxido de fósforo, obteniendo aproximadamente 120 mg de un polvo blancuzco.

Se puede contaminar el R-451B, así obtenido, con vestigios de otros componentes. Sin embargo, cuando se cromatografía de acuerdo con la técnica de Stahl sobre una delgada capa de gel de sílice, usando acetona-benceno (1:1) como agente de elución, seguido por tratamiento con ácido sulfúrico de la placa revelada y secada, resulta detectable solamente una sustancia ubicando así la necesidad de otra purificación.

D) Purificación de R-451C₁

Se disuelve 100 mg del residuo, obtenido de HUV 1,7 a 17,6 (Tabla XII) en 5 ml de acetona. Bajo agitación vigorosa, se agrega la solución acetónica a 50 ml de éter isopropílico. Se filtra el precipitado que se forma, y se le lava con éter isopropílico. Se seca a la temperatura ambiente bajo presión reducida sobre pentóxido de fósforo obteniendo aproximadamente 70 mg de un polvo blancuzco que consiste en R-451C₁. El R-451C₁ purificado, así obtenido, es en esencia biológicamente homogéneo, según resulta de un análisis cuantitativo contra Staphylococcus aureus.

E) Purificación del R-451A

Se enloda 100 mg del residuo, obtenido del grupo de fracción HUV 4,0 a 5,0 de la columna de tierra infusoria (Tabla XI) con 10 ml de

diclorometano. Se filtra y se lava el residuo sólido con diclorometano. Se seca a la temperatura ambiente bajo presión reducida sobre pentóxido de fósforo, obteniendo aproximadamente 70 mg de un polvo blanquecino que consiste en R-451A.

EJEMPLO XIX

Preparación de SP-30 crudo por fermentación de M. Halophytica a escala de laboratorio

A) Etapa de germinación

Se agrega un cultivo liofilizado de M. halophytica a un frasco sacudidor de 300 ml que contiene 100 ml del medio descrito en la parte A del Ejemplo I. Se incuba sobre sacudidor rotativo (280 r.p.m., carrera 5 cm) durante 5 días a 37 °C.

B) Etapa de fermentación

Se transfiere 25 ml del inoculum, obtenido de la etapa precedente de germinación, a cada uno de cuatro frascos de 2 lt, cada uno de los cuales contiene 500 ml del siguiente medio:

Almidón soluble	50 g
Amina NZ Tipo A	10 g
Agua blanda, c.s.	1 lt
pH después de esterilización	7,45

Se incuba los frascos y sus contenidos durante 96 a 120 hr a 28 °C sobre un sacudidor rotativo.

C) Aislación del SP-30 con respecto al sustrato de fermentación

A 3,5 lt del sustrato reunido de la parte B de este ejemplo, se agrega un auxiliar de filtración (tierra infusoria) y se filtra. Se la

va la torta de filtro con varios centenares de mililitros de agua y se agrega los lavados al filtrado (volumen total aproximadamente 3600 ml). Se agrega entonces un volumen igual de acetato de etilo y se agita durante 30 min. Se separa la capa de acetato de etilo y se extrae nuevamente la capa acuosa con un volumen igual de acetato de etilo. Se reúne los extractos y se concentran sobre un evaporador a película bajo presión reducida hasta un residuo. El residuo pesa aproximadamente 4 g y, sobre placas de agar, manifiesta actividad antibiótica contra Staphylococcus aureus ATCC 209P hasta un mínimo de 1 µg/ml.

EJEMPLO XX

Preparación del SP-30 crudo por Fermentación de M. Halophytica a Escala

Técnica

A) Etapa de germinación:

Tal como se ha descrito en el Ejemplo XIX (A).

B) Etapa de Preparación del Inoculum

Se transfiere 25 ml del primer inoculum, obtenido de la etapa precedente de germinación, a cada uno de cuatro frascos de 2 lt, cada uno de los cuales contiene 500 ml del medio estéril utilizado para la germinación. Se incuban los frascos y los contenidos durante 5 días a 28 °C sobre un sacudidor rotativo (280 r.p.m., carrera 5 cm). Se reúne los contenidos de los frascos. Se agrega 25 ml del segundo inoculum así obtenido a cada uno de diez frascos de 2 lt, cada uno de los cuales contiene 500 ml del medio estéril descrito más arriba. Se incuban los frascos y sus contenidos durante 3 a 5 días a 28 °C sobre un sacudidor rotativo (280 r.p.m., carrera 5 cm). Se reúne y se transfiere asépticamente el caldo a un frasco de

inoculum estéril que tiene un brazo lateral (volumen total aproximadamente 5 lt).

C) Etapa de fermentación en tanque

Se transfiere asépticamente los 5 lt del inoculum, obtenido de la parte B de este ejemplo, a un fermentador de 130 lt, que contiene aproximadamente 90 lt del siguiente medio estéril:

Almidón soluble	4500 g
Amina NZ Tipo A	900 g
Antiespumante	100 ml
Agua blanda, c.s.	90 lt

Se fermenta aeróbicamente durante 55 a 65 hr (hasta que el volumen de células empacadas es aproximadamente 4,5 a 5,0 %, según se determina centrifugando una muestra de 10 ml a 2800 r.p.m. durante 5 min) bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	26 °C
Entrada de aire estéril, aprox.	76-80 lt/min
Presión, aprox.	0,5-0,6 atm. por sobre presión atmosférica normal
Agitación	160-165 r.p.m.

Los siguientes datos son típicos para una operación de fermentación de esta clase.

Crecimiento hr	Temp. °C	Entrada aire lt/min	Presión en atm. sobre normal	r.p.m.	pH	Volumen células empaca- das, %	Análisis en disco contra Sta- phylococcus aureus
0	26	76	0,49	160	6,80	-	-

8	26	76	0,55	160	6,95	1,0	-
16	26	76	0,53	160	6,85	1,0	-
23	26	76	0,52	160	7,10	1,5	zona 14 mm
31	26	76	0,53	160	7,35	1-5	-
38	26	79	0,49	165	7,60	2,5	-
46	26	79	0,54	165	7,75	2,5	zona 21 mm
54	26	79	0,52	165	7,90	4,5	-
65	26	79	0,51	165	7,80	5,0	zona 25 mm

D) Aislación de SP-30 de la fermentación en el tanque

10.

Se separa el micelio con respecto al caldo por filtración, utilizando un auxiliar de filtración. Se extrae 90 lt del caldo de cosecha con 2 volúmenes de acetato de etilo después de ajustar primeramente a pH = 7,0. Se concentra el extracto a 3 lt bajo presión reducida. Se elimina la capa de agua que se separa por reposo, y se concentra más todavía hasta aproximadamente 200 ml. Se enfría el concentrado durante la noche y se le filtra. Se agrega el filtrado a 10 volúmenes de éter de petróleo - éter etílico (1:1) y se filtra. Se lava el precipitado con varias porciones de mezcla solvente y se agrega los lavados al filtrado. Se concentra el filtrado y los lavados, que contienen los antibióticos, bajo presión reducida hasta un residuo que consiste en un aceite castaño oscuro que pesa 18 g. Este SP-30 crudo inhibe el crecimiento de Staphylococcus aureus 209P sobre agar a diluciones tan bajas como 1 ug/ml.

15.

20.

EJEMPLO XXI

Resolución del SP-30 en sus componentes

25.

La resolución de SP-30, según se obtiene de acuerdo con uno u

otro de los Ejemplos XIX y XX, se efectúa mediante separación cromatográfica en columna utilizando una tierra infusoria purificada (producto comercial Chromosorb W, de Johns Manville and Company, lavado sin ácido, dimensiones de mallas 60-100) como soporte y portador inerte.

5. Se prepara primeramente una columna de vidrio de aproximadamente 12,7 mm de diámetro y aproximadamente 305 mm de altura, empacándola con una suspensión de Chromosorb W en formamida. Se agrega y se mezcla una pequeña porción de Chromosorb W con 1 ml de una solución metanólica que contiene 408 mg de SP-10 Obtenido del Ejemplo XX (D) 7.
10. Se seca la mezcla bajo presión reducida para eliminar el metanol y luego se empaca cuidadosamente en la parte superior de la columna así preparada.

Se eluye la columna a su vez con 100 ml de las siguientes mezclas solventes:

- | | | |
|-----|-------------------------------|-------------------------|
| 15. | a) benceno-cloroforno (95:5) | saturado con formamida; |
| | b) benceno-cloroforno (90:10) | saturado con formamida; |
| | c) benceno-cloroforno (75:25) | saturado con formamida; |
| | d) benceno-cloroforno (50:50) | saturado con formamida; |
| | e) benceno-cloroforno (25:75) | saturado con formamida. |

20. Se eluye entonces la columna con 600 ml de cloroforno y finalmente con 1000 ml de metanol. Se obtiene un total de 84 fracciones en porciones de 25 ml. Se bioautografa cada porción de 25 ml con respecto a Sisymbrium officinale ATCC 6538P y se retiene aquellas porciones que muestran actividad antibiótica y componentes similares. Se concentra cada una de estas fracciones bajo presión reducida, se agrega agua y se extrae cada una de estas fracciones con cloroforno. Se concentra cada extracto cloro-
- 25.

fórmico por separado a sequedad. Se bioautografía los residuos obtenidos de cada una de estas fracciones en la manera descripta más arriba contra Staphylococcus aureus y se identifica los componentes por posición. Se determina la actividad mediante el método disco común utilizando un disco de 6,3 mm de diámetro impregnado con Staphylococcus aureus. Los resultados de esta investigación se describen en la Tabla XIII.

TABLA XIII

Cromatografía sobre Tierra Infusoria de los Antibióticos del Grupo SP-30

<u>Porción de eluato</u>	<u>Fracción Nº</u>	<u>Contenido del componente</u>
1	A	nada
2-5	B	D (vestigios)
6-16	C	D, C (vestigios)
17-23	D	C, D (vestigios)
24-43	E	C
44-46	F	C, B
47-57	G	B, C (vestigios)
58-80	H	nada
81-84	I	A, B (vestigios), C(vestigios)

Propiedades Físicas y Químicas de los Antibióticos Preparados a Partir de

Los Micro-Organismos Preferidos Descriptos más Arriba

Gentamicina, tal como es producida en la forma descripta más arriba, es un polvo amorfo blanco que tiene las siguientes características físicas y químicas:

I) Punto de fusión (bloque de Kofler): ablandamiento a 102 °C; fusión completa a 108 °C.

II) Análisis:

a) Análisis elemental:

C 50,20 %, H 9,52 %, N 13,47 %, O 27,81 %; (por diferencia)

No están presentes otros elementos.

5. b) Ensayos de grupo cualitativos y cuantitativos:

- | | |
|---|----------|
| 1) Grupo metoxilo | nada |
| 2) Grupos N-metilo | 2,75 % |
| 3) Grupos C-metilo | 2,97 % |
| 4) Nitrógeno Van Slyke | 10,18 % |
| 5) Ensayo de ninhidrina | positivo |
| 6) Ensayo Elson-Morgan (aminoazúcares) | positivo |
| 7) Ensayo de reacción Maltol
(no hay formación de maltol después de calentamiento con álcali) | negativo |
| 8) Ensayo furfural
(no se forman productos de absorción ultravioleta volátiles después de calentamiento con ácido sulfúrico acuoso al 40 % a 100 °C) | negativo |
| 9) Sakaguchi (para guanidinas) | negativo |

10.

15.

III) Peso molecular:

Calculado (en la suposición de un grupo metilo por molécula N-metilo por molécula)

545

Hallado (ebullioscópico en metanol)

543

20.

IV) Rotación óptica:

$$[\alpha]_D^{25} = + 14,6^{\circ} \text{ (1 \% en agua)}$$

V) Solubilidad:

25.

Extremadamente soluble en agua; soluble en medios polares ta-

los como piridina y dimetilformamida, como así también en medios ácidos con formación de sal; moderadamente soluble en metanol, etanol y acetona; insoluble en éter, benceno e hidrocarburos halogenados.

VI) Espectro ultravioleta:

5. Completamente transparente en la zona de 220 a 400 mμ.

VII) Espectro infrarrojo:

La fig. 1 de los dibujos muestra el espectro en Nujol (Nujol es una denominación comercial para un aceite mineral a base de hidrocarburos suficientemente puros para espectroscopia infrarroja, que puede obtenerse de

10. Plough Inc., Memphis, Tennessee), representando λ la longitud de onda en μ , mientras que ν representa la frecuencia en cm^{-1} y A significa absorción. Las crestas de absorción (w = débil, m = moderado, ms = moderado a fuerte, s = fuerte, vs = muy fuerte, sh = oscilón) están situadas en las siguientes longitudes de onda.

15.	λ (μ)	Intensidad de cresta
	3,00	ms
	3,10	sh
	3,25	sh
20.	3,42	s
	4,30	w
	6,35	m
	6,85	s
	7,25	ms
25.	7,50	sh (ancha)

$\lambda(\mu)$	Intensidad de cresta
3,00	m-s
3,45	s
4,27	sh
5. 4,95	w
6,27	m-s
6,64	sh
6,85	s
7,27	s
10. 7,58	w
7,95	sh
8,27	w
8,95	w (ancha)
9,20	m (ancha)
15. 10,25	sh (ancha)
10,98	w
11,49	w (ancha)
13,90	m

B) Sulfato:

20.

Punto de fusión

218-237 °C (desc.)

Análisis elemental:

C 31,22 %, H 6,57 %, N 8,46 %, O 41,63 %; SO₄ 31,22 %.

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{25} = + 102^\circ$ (1 % en agua)

25.

Espectro infrarrojo (en Nujol) (ver fig. 3 de los dibujos que se acompaña):

	<u>λ (m)</u>	<u>Intensidad de cresta</u>
	2,95 → 3,25	s (ancha)
	3,45	vs
5.	4,27	sh
	4,80	w (ancha)
	6,14	m-s
	6,55	m-s
	6,86	s
10.	7,26	s
	7,45	sh
	7,77	w
	8,70 → 9,75	vs (ancha)
	10,27	m
15.	11,38	w (ancha)
	13,88	m

C) Otras sales:

La gentamicina, por acción de los ácidos apropiados (o de sus sales solubles) en medios acuosos es convertible a sales de adición de ácido insolubles o levemente solubles. Cuando el anión de ácido es farmacéuticamente aceptable, la sal que se forma con la gentamicina se hace apropiada para su incorporación en una formulación acuosa o suspensión en aceite. Estas preparaciones, administradas parenteralmente, proveen efectos de depósito con lenta liberación de los antibióticos. En general, los ácidos grasos que tienen 8 o más átomos de carbono proveen estas sales de gentamicina

en que se redujo la solubilidad. Son representativos de tales ácidos el láurico, esteárico, palmítico, oléico, y lo similar. En efecto, otros ácidos se comporta: en una manera similar en el sentido de proveer sales con gentamicina es que sus propiedades hidrófilas están contrarrestadas por un componente hidrófobo previsto por el unión de ácidos. Otros tipos de ácidos que pueden emplearse son los ácidos alifáticos azila sustituidos, tales como el ácido fenilbutírico; ácidos carbonílicos aromáticos tales como el ácido naitalen-1-carboxílico; ácidos sulfúrico y sulfónico sustituidos, tales como el ácido lauril-sulfúrico y dodecil-bencensulfónico, respectivamente; además, el ácido oléico, ácido ferulico y compuestos relacionados tales como el ácido tánico.

IX) Propiedades diversas:

- 1) No hay reacción con exceso de hidrógeno atmosférico 1,8 N a reflujos después de 2 hr; recuperación cuantitativa del material de partida.
15. 2) Actividad antibiótica de la gentamicina completamente destruida por hidrólisis con ácido clorhídrico 6 N a 100 °C en 15 min. con ácido clorhídrico 2 N a 100 °C, es necesario un tiempo de reacción de 7 hr para destruir por completo la actividad.
20. 3) Estabilidad: la actividad de la gentamicina no es alterada significativamente al someter una solución acuosa del antibiótico a una temperatura de 100 °C durante 30 min a través de toda la gama de pH desde 2 a 12.
25. 4) Otros derivados: la gentamicina, al igual que otros antibióticos que tienen grupos amino primario, se transforma a derivados de ácido N-metiloxisulfónico por acción de formaldehído bisulfito de sodio (de preferencia sobre sulfato de gentamicina). La magnitud de la conversión de los grupos a-

mino primario de la gentamicina al derivado de ácido N-metilsulfónico está gobernada por la cantidad de compuesto de adición de formaldehído bisulfito de sodio que se usa en la reacción. El pH del medio a partir del cual se afila el producto determina cuándo el producto es un ácido metansulfónico o una sal del mismo.

5. Se preparan otros derivados análogos de sulfonate mediante la acción sobre gentamicina de los compuestos de adición de cetonas o aldehídos alifáticos o aromáticos con bisulfito. Estos derivados manifiestan índices terapéuticos alterados en comparación con el antibiótico de origen. El derivado de la gentamicina en el cual todos los grupos amino primario resultan haber sido convertidos a sus respectivos ácidos N-metilsulfónicos se prepara en la manera descrita en el Ejemplo X. Las propiedades de este derivado son las siguientes: soluble en agua, insoluble en metanol; $[\alpha]_D^{25} + 49,7$ (1% en agua); bandas de absorción infrarroja a 2,90 u (s), 6,08 u (m-s), 6,90 u (sh), 8,72 u (vs) u 9,62 u (s).

15. X) Propiedades cromatográficas sobre papel.

La gentamicina, tal como se determina mediante cromatogramas sobre papel, es diferente de otros antibióticos básicos. Para obtener el cromatograma se emplea un sistema ascendente. La Tabla XIV describe los valores R_f comparativos (los valores conectados mediante un guión indican una franja, mientras que los no conectados indican puntos separados y discretos) en siete sistemas diferentes. Los antibióticos producidos por especies conocidas de *Micromonospora* difieren en términos generales de la gentamicina por el hecho de que no son bases, no tienen espectro amplio en su actividad antibiótica, y no son extractables con una resina Amberlite tipo INO-50, como se describe en este caso.

25.

TABLE XIV

Comparación de Valores R_p de la Gentamicina en Diferentes Sistemas con los de Otros Antibióticos Músculos

Antibióticos	Sistema (1) y valor R_p						
	A	B	C	D	E	F	G
5. Gentamicina	0,59	0,26	0,1	0,3	0,45	0,0- 0,25	0,0- 0,48
Neomicina	0,22	0,12	0,29	0,0	0,05 0,20	0,0- 0,13	0,0- 0,50
Kanamicina	0,30	0,18	0,25	0,0- 0,35	0,15 0,25	0,02	0,76
10. Neomina	0,30	-	-	-	0,30	0,05	0,75
Estreptomina	0,57	0,40	0,21	0,06	0,03 0,19	0,0	0,0- 0,33
Estreptomicina	0,36	0,30	0,27	0,27	0,09	0,0	0,18
Paromomicina	0,33	0,11	0,36	0,0	0,03- 0,29	0,03	0,25
15. Viomicina	0,27	0,19	0,51	-	0- 0,25	0,0	0,41- 0,65
Dihidroestreptomina	0,53	0,36	0,18 0,45	-	0,03- 0,3	0,0	0,22

1) Sistemas:

20. A) 80% de metanol (en agua) + 3% de NaCl, utilizando papel regulado a pH 2,3 con sulfato-bisulfato.
 B) Propanol-piridina-ácido acético-agua (15,10:3:12).
 C) Propanol-agua-ácido acético (90,40:5)
 D) 80% de fenol acuoso.
 E) n-butanol saturado con agua que contiene 2% de ácido p-toluenosulfónico.
25. -

F) Butanol-agua (84:16) + 2 % de piperidina.

G) Agua-butanol (94:6) + 0,25 % de ácido p-toluensulfónico.

BA-3 (mezcla de fracciones A y B), preparado en la manera descrita más arriba, manifiesta las siguientes propiedades físicas y químicas

5. I) Análisis:

a) Análisis elemental cualitativo:

C, H, N, O; no están presentes otros elementos.

b) Ensayos de grupo cualitativos:

1) Ninhidrina	positivo
2) Elson-Morgan	positivo
3) Maltol	negativo
4) Furfural	negativo
5) Sakaguchi	negativo
6) Grupos metoxilo	negativo

15. II) Solubilidad:

Similar a la de la gentamicina.

III) Espectro ultravioleta:

Transparente en la gama de 220 a 400 mμ.

20. IV) Formación de la sal:

Sulfato: polvo amorfo blanco; soluble en agua, insoluble en etanol, metanol, acetona y otros solventes orgánicos comunes.

V) Cromatografía sobre papel:

25. Manifiesta los mismos valores R_F que la gentamicina en los sistemas A, B, C, D, E y G (ver Tabla XIV). En el sistema E, se observa una resolución con BA-3 (fracción A) que manifiesta un valor R_F de 0,15 y BA-3 (fracción

B) que manifiesta un valor R_F de 0,23, en comparación con el valor R_F de la gentomicina en este sistema de 0,45.

R-451 crudo, tal como se produce por el método del Ejemplo XI, (D), es una substancia amorfa incolora que tiene las siguientes características físicas y químicas.

I) Punto de fusión:

200 a 204°C.

II) Análisis (ensayos de grupo cualitativos):

- | | |
|-------------------------|----------|
| 1) Ensayo de ninhidrina | negativo |
| 2) Cloruro férrico | negativo |

III) Rotación óptica:

$$[\alpha]_D^{25} = -16^\circ \text{ (0,5 \% en cloroformo).}$$

IV) Solubilidad:

Soluble en agua; insoluble en éter de petróleo; soluble en la mayor parte de los solvente orgánicos comunes; dializable a través de una membrana de celofán en un sistema metanol-metanol.

V) Espectro ultravioleta:

La fig. 4 de los dibujos que se acompaña muestra el espectro de absorción en metanol con una concentración de 5 g/100 ml. (λ representa la longitud de onda en μ , D representa la densidad óptica): $\lambda_{\text{máx}}$ a 288 μ (E 1% = 50).

(VI) Espectro infrarrojo: (en Nujol) (ver fig. 5)

Las crestas de absorción están situadas en las siguientes longitudes de onda:

	<u>λ (μ)</u>	<u>Intensidad de cresta</u>
	2,92	s
	5,84	m
5.	6,00	} m (ancha)
	6,12	
	6,45	m-s
	8,00	sh
	8,07	s
10.	8,33	m-s
	8,55	sh (ancha)
	9,10	s (ancha)
	9,60	s (ancha)
	10,26	m-s
15.	10,55	m-s
	11,02	w

VII) Stabilidad:

Inestable por debajo de pH = 7 a 20 °C. Se mantiene la actividad por encima de pH = 7, aún después de calentamiento durante 30 min a 100 °C.

20. VIII) Propiedades cromatográficas sobre papel:

Quando se prepara un cromatograma sobre papel en la manera indicada más adelante y se localiza bioautográficamente los puntos con respecto a Staphylococcus aureus en la manera descripta más arriba, se determinará en las siguientes maneras los valores R_f del R-451 en diferentes sistemas.

Sistema solvente utilizado

	<u>R_g</u>
A) metanol acuoso al 80 % + 3 % cloruro de sodio; ascendente; papel previamente regulado a pH = 2,3 mediante sulfato-bisulfato	0,80
B) n-propanol-piridina-agua-ácido acético (15:10;3:12); ascendente	1,0
C) n-propanol-agua-ácido acético (50:40:5)	0,93
D) Fenol acuoso al 80 %; ascendente	0,95
E) Benceno-metanol (9:1); ascendente	1,0
F) Benceno-cloroformo (95:5); descendente; papel primeramente saturado con formamida-metanol (1:1) y luego secado al aire para eliminar el metanol antes del uso.	0,0
G) Benceno-éter de petróleo (gama de ebullición 30 a 60 °C)-acetona (10:2,5:5); descendente	0,0; 0,14; 0,28; 0,64.

De los componentes individuales del R-451, el componente R-451A, tal como es producido por el método del Ejemplo XVIII (E), es una sustancia amorfa incolora que tiene las siguientes propiedades.

I) Espectro ultravioleta:

Transparente en la gama de 220 a 360 m μ .

II) Espectro infrarrojo: (en Nujol) (ver fig. 6)

Las crestas de absorción están situadas en las siguientes longitudes de onda y son todas anchas y de intensidad fuerte: 2,90 μ , 6,25 μ , 8,25 μ y 10,00 μ .

El R-451B, tal como es producido por el método del Ejemplo XVIII (C), es una sustancia amorfa incolora que tiene las siguientes propiedades.

I) Espectro ultravioleta:

Transparente en la gama de 220 a 360 m μ .

II) Espectro infrarrojo (en Nujol) (ver fig. 7):

Las crestas de absorción están situadas en las siguientes longitudes de onda con las intensidades indicadas.

	<u>λ (μ)</u>	<u>Intensidad de cresta</u>
5.	2,94	m-s
	5,72	s
	5,80	m-s
	7,92	m-s
10.	8,60	m-s
	9,10	s (ancha)
	9,64	s (ancha)
	12,50	m-s (ancha)
	13,90	m-s (ancha)

15. El R-451D, tal como se le produce aquí, es un polvo amorfo blanco que tiene las siguientes características físicas y químicas.

I) Punto de fusión (bloque de Kofler):

138 a 140 °C.

II) Análisis:

20. a) Elemental:

C 52,02 %, H 6,81 %, N 0,72 %, Cl 5,04 %.

b) Análisis de grupo cuantitativo:

$\text{OCH}_3 = 14,15 \%$.

c) Ensayos de grupo cualitativos:

25. 1) Ensayo de ninhidrina negativo

- | | |
|---|--------------------------|
| 2) Ensayo Elson-Morgan | positivo |
| 3) Ensayo $KMnO_4$ alcalino | positivo |
| 4) Ensayo de antrona | azul grisáceo |
| 5) Ensayo de 2,4-dinitro-fenilhidrazina | positivo |
| 6) Ensayo Ehrlich (difenilamina) | negativo |
| 7) Ensayo trifenil-tetrazolio | negativo |

III) Rotación óptica:

$$[\alpha]_D^{25} = + 29,2^{\circ} \text{ (1 \% en dioxano).}$$

IV) Solubilidad:

Muy soluble en cloroformo, cloruro de metileno, acetona y metanol; escasamente soluble en éter; insoluble en éter de petróleo, tolueno, benceno, agua.

V) Espectro ultravioleta:

La fig. 4 de los dibujos que se acompaña muestra el espectro en metanol (concentración 2,97 mg/100 ml): $\lambda_{\text{máx}}$ a 290 a 295 $m\mu$ ($E^{1\%} = 37$). En una solución de 6 ml de hidróxido de potasio 1,0 N diluido con metanol a 100 ml $E^{1\%} = 79$.

VI) Espectro infrarrojo (en Nujol) (ver fig. 8 de los dibujos):

Las crestas de absorción están situadas en las siguientes longitudes de onda:

$\lambda(\mu)$	<u>Intensidad de cresta</u>
2,88	s
5,73	s
6,13	m-s

	6,33	D=0
	6,45	0
	7,98	0
	8,32	0
9.	8,50	0
	10,00	0
	10,22	0
	10,55	0
	11,00	D=0
10.	11,55	D=0
	12,30	w
	12,98	w
	13,55	D=0
	13,87	D=0

15. VII) Resolución de derivados:

a) Acetato preparado como en el ejemplo XVI:

p.f. = 135 a 136 °C;

máximo de absorción U.V. a 205 m/μ ($\epsilon^{1\%} = 9,2$);

Análisis elemental: C 53,08 %, H 7,08 %, N 0,77 %;

20. Bandas de absorción de infrarrojo (en Kujol) según se indica a continuación:

	(n)	Intensidad
	<u>2,85</u>	<u>w (ancha)</u>
25.	9,57	D=0

5,71	s
6,14	w
6,45	m-s
8,02	s
8,38	m-s
8,88	s
9,17	s
9,55	s

VIII) Estabilidad:

10. R-451D es estable a 0 °C y en la obscuridad. A la temperatura ambiente, en la luz solar directa, la actividad antibiótica disminuye lentamente después de 24 hr y queda completamente destruida después de aproximadamente 3 semanas. En solvente metanol, el R-451D es estable durante por lo menos 2 semanas. Se produce rápida desactivación a pH inferior a 5,5, mientras que para pH superior a 7 y hasta 14, se mantiene la actividad durante unos pocos días. Por tratamiento con HCl metanólico 0,1 N a la temperatura ambiente durante 16 hr, queda destruida la actividad antibiótica. El tratamiento de la mezcla ácida con una cantidad estequiométrica de bicarbonato de sodio (solución acuosa al 2 %), seguido por eliminación del metanol mediante concentración bajo presión reducida y extracción con cloroformo, suministra una mezcla de cinco componentes según se determina mediante cromatografía en capa delgada sobre gel de sílice usando benceno-acetona (75:25) como solvente y ácido sulfúrico como rociado reactivo. Todos los componentes son menos polares que el R-451D. Por tratamiento con NaOH 1,0 N a la temperatura ambiente durante 16 hr, se mantiene completamente la actividad del R-451D

15.

20.

25.

R-451E, aislado y purificado en la manera descripta más arriba (ver Ejemplo XVII), es un polvo amorfo casi incoloro que tiene las siguientes propiedades físicas y químicas.

I) Punto de fusión: 89 a 96 °C.

8. II) Análisis:

a) Análisis elemental cuantitativo:

C 65,17 %, H 7,54 %, N 1,31 %, O 24,23 %.

b) Ensayos de grupo cualitativos:

1) Ensayo de ninhidrina	negativo
2) Ensayo Elson-Morgan	positivo
3) Ensayo con $KMnO_4$ alcalino	positivo
4) Ensayo de antrona	positivo
5) Ensayo de 2,4-dinitro-fenilhidrazina	positivo
6) Ensayo Ehrlich (con difenilamina)	negativo
7) Ensayo trifenil-tetrazolio	positivo

10.

15.

III) Rotación óptica:

$[\alpha]_D^{25} = + 36,7^\circ$ (1 % en dioxano).

IV) Solubilidad:

20.

Soluble en cloroformo, cloruro de metileno, acetona, metanol y éter; escasamente soluble en benceno, tolueno y hexano; insoluble en agua.

V) Espectro ultravioleta:

La fig. 4 de los dibujos que se acompaña muestra el espectro en metanol con una concentración de 3,0 mg/100 ml: $\lambda_{\text{máx}} = 240 \text{ m}\mu$ ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 232$).

VI) Espectro infrarrojo (en Nujol) (ver fig. 9 de los dibujos):

25.

Las crestas de absorción están situadas en las siguientes longitudes

de onda con la intensidad que se indica.

	<u>$\lambda(\mu)$</u>	<u>Intensidad de cresta</u>
	2,94	m-s
	5,68	s
5.	5,76	s
	5,83	s
	6,00	vs
	6,16	m-s
	6,22	m-s
10.	7,87	vs
	8,31	w
	8,55	w
	8,96	w
	9,33	w
15.	9,55	w
	9,77	m-s
	10,50	w
	10,90	w
	11,26	m-s
20.	11,42	w
	12,22	w
	12,62	m-s

Los antibióticos del grupo SP-30 son solubles en la mayoría de los solventes orgánicos tales como acetato de etilo, cloroformo, cloruro

25.

de metileno (y otros hidrocarburos halogenados) y alcoholes inferiores (por ejemplo metanol y etanol); tienen mínima solubilidad en agua. Del caldo de fermentación, a un pH = 2-9,5, se extrae fácilmente el SP-30 mediante butanol, acetato de etilo, cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, benceno o éter.

9. Cuando se somete a ciertos ensayos de grupos cualitativos, el SP-30 y sus componentes individuales manifiestan las siguientes acciones:

Ensayos de ninhidrina y Sakaguchi negativo

(El SP-30 crudo como así también todos sus componentes individuales).

10. Azúcares reductores

(con nitrato de plata amoniacal) positivo

(de los componentes individuales, A es fuertemente positivo, mientras que B, C y D son negativos).

Reducción de ferricianuro positivo

11. (de los componentes individuales, A reacciona negativo mientras que B, C, y D son positivos).

El SP-30 y sus componentes fraccionados, en solución metanólica, son absorbentes en el ultravioleta en la gama de 220 a 400 m μ con las siguientes características específicas: el SP-30 crudo tiene una curva de absorción no trazada con puntos de inflexión a 260 m μ y 290 m μ , teniendo el punto a 260 m μ un E^{1%} de aproximadamente 28; el SP-30A tiene una curva de tipo similar con una inflexión a 258 m μ (E^{1%} aproximadamente 70) y una segunda inflexión aproximadamente a 295 m μ ; el SP-30B manifiesta un máximo a 268 m μ (E^{1%} aproximadamente 111); el SP-30C no muestra máximos sino inflexi

12.

ones a 265 μm ($E^{1\%}$ aproximadamente 181) y aproximadamente a 290 μm ; el SP-300 manifiesta un máximo a 263 μm ($E^{1\%}$ aproximadamente 115).

Los espectros infrarrojos del SP-30 y sus componentes individuales, suspendidos en Nujol, están ilustrados en las figs. 10 a 14, respectivamente, de los dibujos que se acompaña. Las crestas de absorción y las características de las bandas se indican en las siguientes tabulaciones.

	SP-30 (ver fig. 10)	Intensidad de cresta
	<u>$\lambda(\mu)$</u>	
	2,98	s
	5,78	s
10.	6,00	m-s (ancha)
	6,58	w
	6,81	m-s
	7,02	w (sh)
	7,22	m
11.	7,71	m-s (sh)
	7,83	a
	8,32	w (sh)
	8,86	m-s
	9,28	m-s
	9,54	ancha
20.	9,75	ancha
	13,42	m
	14,20	w (ancha)

	SP-30A (ver fig. 11) λ (μ)	Intensidad de cresta
	2,95	s (ancha)
	3,42	m
5.	5,82	s (sh)
	5,89	s
	6,15	m (sh)
	6,60	w
	6,80	w
10.	7,16	m-s
	7,56	m (ancha)
	8,50	w
	9,22	w
	9,46	w
15.	SP- 30B (ver fig. 12) λ (μ)	Intensidad de cresta
	2,98	w (ancha)
	5,72	m-s
	5,80	m-s
	6,79	m-s
20.	7,15	m-s
	7,21	m-s
	7,88	s
	8,70	s (ancha)
	10,00	s (ancha)
25.	11,51	m-s
	12,00	s (ancha)

	13,00	s (ancha)
	SP-300 (ver fig. 13)	Intensidad
	<u>λ (μ)</u>	<u>de cresta.</u>
	2,95	w (ancha)
	5,74	s
5	6,20	w (sh)
	6,79	m-s
	7,20	m
	7,70	s (sh)
	7,82	s
10.	8,85	s
	9,28	s
	9,56	m
	9,60	m (ancha)
	9,90	m (ancha)
15.	11,50	w (ancha)
	12,00	m-s (ancha)
	12,80	m-s (ancha)
	13,35	w (ancha)
	14,15	w (ancha)
	SP-300 (ver fig. 14)	Intensidad
	<u>λ (μ)</u>	<u>de cresta.</u>
	2,95	m
	5,75	s
	6,00	m (sh)
25.	6,16	w (sh)

	6,30	w (sh)
	6,56	w (sh)
	6,78	m-s
	7,20	m
5.	7,28	w (sh)
	7,70	s (sh)
	7,80	s (sh)
	7,88	s
	8,32	w
10.	8,52	w (sh)
	8,88	s
	9,28	s
	9,42	m-s (ancha)
	9,56	m-s (ancha)
15.	9,72	m-s (ancha)
	10,44	w
	11,30	w (ancha)
	11,60	w (ancha)
	11,82	w (sh)
20.	12,42	s
	13,32	m (ancha)
	13,48	m (ancha)
25.	14,20	m (ancha)

La estabilidad del SP-30 varía entre un componente y otro. En particular, la Fracción A es estable a la temperatura ambiente mezclada con un regulador acuoso a una gama de pH de 2 a 10. A 100 °C su actividad antibiótica disminuye a medida que el pH está por debajo de 6. Su actividad se destruye a pH 2 por calentamiento a 100 °C durante 30 min mientras que no se observa pérdidas en la actividad bajo condiciones similares a pH 7 y más. La fracción B es estable a pH 2 a 10 a la temperatura ambiente. A temperatura elevada (100 °C) sigue siendo estable hasta pH 2 durante 30 min, punto en el cual su actividad disminuye. La fracción C es estable sobre la gama de pH de 2 a 10 aún a 100 °C durante 30 min. La fracción D es estable desde un pH 2 hasta 10 a la temperatura ambiente, y desde pH 4 hasta 10 a 100 °C durante 30 min.

Propiedades Biológicas de los Antibióticos Obtenidos de los

Ejemplos Precedentes

La gentamicina posee un amplio espectro antibacteriano y antirraquitismo. Es un útil agente anti-infeccioso capaz de inhibir eficazmente ciertas manifestaciones de trastornos producidos por Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae y otros organismos patógenos. Es también útil en el tratamiento de la mastitis en el ganado.

Es particularmente eficaz para combatir infecciones en el tracto urinario producidas por organismos gram-negativos tales como especies de Proteus y Pseudomonas. Se sabe que aumenta la cantidad de infecciones hospitalarias debidas a los organismos gram-negativos. La gentamicina resulta particularmente útil en el tratamiento de esta clase de infecciones

gram-negativas crónicas en el riñón y en la vejiga aún en pacientes refrag

tarios, la alta actividad antibiótica de la gentamicina contra infecciones por Proteus y Pseudomonas permite fácilmente la utilización clínica. Como ejemplo particular de dicho efecto se ha empleado exitosamente la gentamicina para tratar una infección crónica en el riñón por Pseudomonas a una do-

5. sis de 1 mg/kg, administrada tres veces por día. Esta infección que no respondía bien a otra terapia fué completamente eliminada de la orina después de 1 día de tratamiento y no se repitió aún después de 10 días. Se obtuvo respuestas contra diversas infecciones por Proteus. Resulta por lo tanto que la gentamicina posee una ventajosa combinación de tipos únicos de actividad juntamente con baja toxicidad que permite su uso con preferencia a otros antibióticos.

10. La actividad antibiótica de la gentamicina es 1120 unidades por miligramo; la de su clorhidrato es 820, y la de su sulfato es 800 unidades por miligramo.

15. La actividad in vitro comparativa de la gentamicina contra una variedad de organismos gram-positivos, gram-negativos y fijos al ácido se indica en la Tabla XV. La susceptibilidad de los micro-organismos al antibiótico se determina mediante el método normal de dilución en tubo de la siguiente manera. Se emplea, como inoculum, en cada caso 10^{-5} diluciones de cultivos de caldo de 24 hr con los puntos finales tomados después de la incubación durante 24 hr a 37°C. A menos que se indique lo contrario, el medio de crecimiento consiste en un caldo de infusión sesos-corazón (Difco).
20. En la tabla, los sulfatos de los antibióticos particulares se utilizan en los ensayos contra los micro-organismos enumerados aquí. Sin embargo, las
25. concentraciones inhibitorias mínimas se expresan en términos del antibiótico

de base pura.

TABLE IV

Espectro Antibiótico (Actividad in vitro) de la Gentamicina en Comparación con Kanamicina y Neomicina

5.	Micro-organismo ensayado		Concentración inhibidora mínima (ug/ml)		
	<u>Nombre sistemático</u>	<u>Denominación de cepa (1)</u>	<u>Gentamicina</u>	<u>Kanamicina</u>	<u>Neomicina</u>
	<u>Gram-positivo</u>				
	Bacillus cereus var. mycoides	DA 35	0,5	8,0	0,5
10.	Bacillus cereus var. mycoides	DA 34	0,5	1,5	0,5
	Bacillus cereus var. mycoides	ATCC 7064	0,75	3,0	2,0
	Bacillus megatherium	DA 31	0,075	0,25	0,075
15.	Bacillus subtilis	ATCC 6613	0,015	0,035	0,015
	Bacillus sphaericus	DA 32	0,1 (2)	0,75	0,25
	Bacillus sphaericus	DA 33	0,05 (2)	0,75	0,075
	Brucella abortus	DA 70	0,25	0,75	0,5
	Staphylococcus aureus	ATCC 6538P	0,075	0,75	0,1
10.	Staphylococcus aureus	ATCC 12715	0,035	0,5	0,035
	Staphylococcus aureus	ATCC 6538	0,175	0,75	0,375
	Staphylococcus aureus	ATCC 9996	0,25	1,5	0,75
	Staphylococcus aureus	ATCC 1163	0,175	0,75	0,375
	Staphylococcus aureus	Gray	0,375	1,5	0,25
5.	Staphylococcus aureus	Smith	0,25	0,75	0,375

	Staphylococcus aureus	DA 40	0,25	1,5	0,25
	Staphylococcus epidermidis	DA 41	0,375	0,25	0,25
	Sarcina lutea	ATCC 9341A	0,25	0,75	0,25
5.	Sarcina lutea	ATCC 9341	0,25	3,0	0,25
	Streptococcus pyogenes	DA 21	6,0 (3)	32,0	16,0
	Streptococcus fecalis	DA 20	12,0	>100,0	16,0
	Streptococcus fecalis	ATCC 10541	12,0	>100,0	48,0
10.	Micrococcus flavus	DA 60	0,075	6,0	0,75
	Corynebacterium simplex	DA 80	20,5	-	0,25
	<u>Gram-Negativo</u>				
	Aerobacter aerogenes	DA 90	0,75	94,0	24,0
	Aeromonas salmonicida	DA 100	0,25	3,0	0,25
15.	Alcaligenes sp.	ATCC 10153	0,025	0,5	0,75
	Alcaligenes fecalis	ATCC 8750	1,5	3,0	1,5
	Escherichia coli	DA 110	1,25	12,0	3,0
	Escherichia coli	ATCC 10586	1,5	12,0	6,0
	Escherichia intermedia	DA 111	0,375	1,5	1,5
20.	Klebsiella pneumoniae	DA 1	0,35	0,75	0,375
	Proteus hydrophila	DA 120	0,5	12,0	12,0
	Proteus vulgaris	DA 121	6,0	16,0	12,0
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 10197	0,1	0,25	0,25
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	0,25	12,0	1,5
25.	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9721	0,25	6,0	1,0
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 10145	0,25	12,0	3,0

Pseudomonas aeruginosa	ATCC 8709	0,25	12,0	1,5
Salmonella schottmulleri	DA 10	1,5	12,0	1,5
Salmonella typhimurium	DA 11	6,0	12,0	12,0
Salmonella typhimurium	ATCC 9187	3,0	12,0	12,0

Fijo al ácido

Mycobacterium smegmatis	DA 150	0,15 (4)	-	-
Mycobacterium tuberculosis	H 37 RV	0,20 (5)	-	-

1) DA se refiere al número de la colección de la Shering Corporation.

2) 1 % de extracto de levadura, 1 % de medio de dextrosa.

3) 5 % de suero humano agregado.

4) Caldo de levadura-carne (Difco).

5) Dubos - Medio + "tween 80" (= mono-oleato de poli-oxietileno-sorbitano).

Se ensaya también la actividad in vivo contra ciertas infecciones bacterianas en los ratones. Se infecta los ratones con un inoculum de la bacteria particular administrada mediante inyección intraperitoneal. Se los trata entonces mediante inyecciones subcutáneas de sulfato de gentamicina (724 unidades por miligramo) disuelto en agua, administrándose dicha inyección en dos dosis diarias igualmente divididas. Se determina la dosis protectora para diversos porcentajes de animales inyectados, en la manera que se indica en la Tabla XVI.

TABLA XVI

Actividad in vivo de la Gentamicina

<u>Micro-organismo infectante</u>	<u>Dosis de gentamicina ug/ratón/día</u>	<u>Porcentaje de supervivencia</u>
Klebsiella pneumoniae	0 (solución salina testigo)	0
5.	20	20
	30	50
	40	80
	50	100
10.	Staphylococcus aureus (Gray)	40
	60	50
	80	100
15.	Salmonella schottmulleri	50
	80	50

La toxicidad aguda de la gentamicina en los ratones se determina en la manera común mediante una variedad de vías. Utilizando el sulfato de gentamicina descripto más arriba en los ratones que pesan 18 a 20 g se obtiene los siguientes datos:

<u>Modo de administración</u>	<u>LD₅₀ (ug/kg ratón)</u>
Subcutánea	675
20. Intra-peritoneal	550
Intravenosa	75
Oral	10.000

La gentamicina manifiesta además actividad in vivo antiviral contra Rickettsia akari. Se infecta cada grupo de huevos embrionados de 6 días de edad con 50 veces la LD₅₀ de Rickettsia akari. Una única dosis de 3,0mg

de gentamicina, administrada 3 hr antes de la infección, da una protección de 50 % (DP₅₀). Se obtiene una protección de 20 % cuando el tratamiento con gentamicina comienza 2 hr después de la infección. Se obtiene una protección de 100 % en ratones infectados intracerebralmente con aproximadamente 450 veces la DL₅₀ de Rickettsia akari mediante 5 mg de gentamicina administrada subcutáneamente 4 hr antes de la infección y que se continúa durante 4 días a 5 mg por día en dos dosis diarias. Cuando se retarda el tratamiento con gentamicina 48 hr después de la infección intracerebral, se obtiene todavía una protección de 100 % mediante administración subcutánea de 10 mg por día (2 dosis de 5 mg cada una) durante 5 días.

La gentamicina y sus sales manifiestan un efecto terapéutico cuando se las ensaya en los ratones contra la copa H 37 RV de Mycobacterium tuberculosis.

BA-3; Utilizando una solución de la mezcla, dando dicha solución por análisis 10 unidades por mililitro (basado en el método de ensayo aplicado para la gentamicina), la actividad antibiótica es demostrable contra Staphylococcus aureus, Streptococcus fecalis, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Salmonella schottmuelleri, Pseudomonas aeruginosa, y Klebsiella pneumoniae. La mezcla resulta ser inactiva contra Rickettsia akari en los ratones a 10 mg/día. Su actividad antibiótica (ensayada como para la gentamicina) es de aproximadamente 200 unidades por miligramo.

Los Antibióticos del Grupo R-451, particularmente el R-451 y el R-451D, y los Del Grupo SP-30, poseen una amplia gama de actividad contra organismos gram-positivos. Tienen particular valor en el tratamiento de enfermedades producidas por micro-organismos resistentes a la penicilina

(ver Tablas XVII, XXI y XXIV). Son útiles también en el tratamiento de enfermedades producidas por Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae y otros micro-organismos patógenos.

TABLA XVII

Espectro antibiótico in vitro del R-451

5.

Micro-organismos ensayados

10.

15.

20.

25.

<u>Nombre sistemático</u>	<u>Designación de la cepa</u>	<u>Concentración inhibitoria mínima (µg/ml)</u>
Bacillus cereus	ATCC 7064	0,75
Bacillus cereus var. mycoides	DA-39	0,25
Bacillus megatherium	DA-31	0,75
Bacillus subtilis	ATCC 6633	0,25
Staphylococcus albus	DA-2100	0,10
Staphylococcus aureus	ATCC 6538P	0,075
Staphylococcus aureus	ATCC 1163	0,25
Staphylococcus aureus	ATCC 12715	0,75
Staphylococcus aureus	Gray	0,50
Staphylococcus aureus	DA-201 (1)	0,10
Staphylococcus aureus	DA-202 (2)	0,25
Staphylococcus aureus	DA-203 (3)	0,30
Staphylococcus aureus	DA-204 (3)	0,15
Staphylococcus aureus	DA-205 (3)	0,40
Streptococcus fecalis	DA-20	0,75
Streptococcus pyogenes	ATCC 12384	0,175
Streptococcus pyogenes	DA-21	0,375

- 1) Cepa resistente a la novobiocina.
- 2) Cepa resistente a la oleandomicina y eritromicina.
- 3) Cepas resistentes a la penicilina.

9. Los antibióticos del grupo R-451 son también activos contra ciertos micro-organismos atacados por las penicilinas. Sin embargo, se ha determinado que son diferentes de las penicilinas, según queda demostrado por la incapacidad de la penicilinasasa para desactivar ya sea el R-451 o el R-451D. Además, el uso de estos antibióticos es también aplicable a pacientes que manifiestan o se sabe que manifiestan sensibilidad resultante de la terapia con penicilina y/o de la terapia que utiliza derivados sintéticos de la penicilina, que es un fenómeno comparativamente frecuente, que aparece en el caso de aproximadamente 8 a 10 % de la población de los Estados Unidos de América.

10. El R-451 crudo, obtenido en la manera descrita en el Ejemplo XI, es, entre otros, un útil agente anti-infeccioso capaz de inhibir ciertas manifestaciones de trastornos causados por Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Diplococcus pneumoniae y otros organismos patógenos. Su actividad in vitro comparativa contra una variedad de organismos se describe en la Tabla XVII (determinada como para la gentamicina; sin embargo, en un medio de crecimiento de extracto de levadura-extracto de carne-glucosa). Se determina como para la gentamicina su actividad in vivo contra ciertas infecciones bacterianas en los ratones (18 a 20 g). En la Tabla XVIII se muestran los resultados. Se obtiene también 100 % de protección mediante la vía oral contra Streptococcus pyogenes administrando 400 µg (20 mg/kg ratón) en dos dosis iguales comenzando 1/2 hr antes de la

15.

20.

25.

infección. La toxicidad aguda del R-451 se ha determinado como para la gentamicina con los siguientes resultados:

<u>Modo de administración</u>	<u>DL₅₀ (mg/kg ratón)</u>
Subcutánea	1000
Intraperitoneal	1000
Intravenosa	850
Oral	>2500

TABLA XVIII

Actividad in vivo del R-451

<u>Micro-organismo infectante</u>	<u>Dosis del R-451 µg/ratón/día</u>	<u>Porcentaje de supervivencia después de 24 hr</u>
Streptococcus pyogenes	0 (solución salina testigo)	0
	40 (2 mg/kg)	50
	40 (2 mg/kg), única inyección 1 hr después de la infección	100
Staphylococcus aureus	40 (2 mg/kg)	50
Diplococcus pneumoniae	50 (2,5 mg/kg)	100 (después de 2 días)

El R-451A, obtenido tal como se describió en el Ejemplo XVIII (E) y el R-451B, obtenido tal como se describió en el Ejemplo XVIII (C), mediante método de ensayo en disco (diámetro del disco 6,3 mm), con lo cual la zona de inhibición se mide después de disponer un disco, impregnado con el antibiótico respectivo sobre una placa de agar sembrada con organismo de ensayo e incubada 24 hr a 37 °C, muestra una actividad in vitro

contra ciertos micro-organismos tal como se muestra en las Tablas XIX y XX, respectivamente. La actividad in vivo del R-451B se determina como para el R-451, con los siguientes resultados: Staphylococcus aureus DP₅₀ = 500 µg/ratón (25 mg/kg/ratón); Streptococcus pyogenes DP₅₀ = 80 µg/ratón (4 mg/kg ratón).

TABLA XIX

Actividad in vitro del R-451A

Concentración del R-451A (µg/ml)	Zona de inhibición (mm diámetro) contra		
	<u>Staphylococcus aureus</u>	<u>Streptococcus fecalis</u>	<u>Bacillus subtilis</u>
1000	18	23	13
100	9	15	10
10	0	10	0
1	0	7	0

TABLA XX

Actividad in vitro del R-451B

Concentración del R-451B (µg/ml)	Zona de inhibición (mm diámetro) contra		
	<u>Staphylococcus aureus</u>	<u>Streptococcus fecalis</u>	<u>Bacillus subtilis</u>
1000	23	30	17
100	20	26	8
10	15	22	0
1	8	15	0

El R-451D, obtenido en la manera descrita en el Ejemplo XV, manifiesta una actividad in vitro contra una variedad de organismos gram-positivos tal como se indica en la Tabla XXI, determinada como para el R-451. Su actividad in vivo se determina también como para el R-451. Los

resultados de dichos ensayos se muestran en la Tabla XXII. La toxicidad aguda del R-451D, según se determinó en los ratones, es la siguiente:

<u>Modo de administración</u>	<u>DL₅₀ (mg/kg ratón)</u>
Subcutánea	1000
Intraperitoneal	500
Intravenosa	150

TABLA XXI

Espectro Antibiótico del R-451D (Actividad in vitro)

<u>Micro-organismo ensayado</u>	<u>Concentración inhi-</u>	
	<u>Designación</u>	<u>bidora mínima del</u>
<u>Nombre sistemático</u>	<u>de la cepa</u>	<u>R-451D (µg/ml)</u>
Bacillus cereus	ATCC 7064	0,25
Bacillus cereus var. mycoides	DA 39	0,075
Bacillus megatherium	DA 31	0,25
Bacillus megatherium	QMCC 3773	0,025
Bacillus megatherium	DA 38	0,25
Bacillus sphaericus	DA 32	0,75
Bacillus sphaericus	DA 33	0,25
Bacillus subtilis	ATCC 6633	0,25
Diplococcus pneumoniae ⁽¹⁾	DA 150	0,25
Sarcina lutea	ATCC 9431	0,0075
Staphylococcus albus	DA 2100	0,25
Staphylococcus aureus (10 aislados clínicos resistentes a la peni- cilina, estreptomici- na, tetraciclina y e- ritromicina)	DA 2027-2036	cada 0,25

Staphylococcus aureus	Gray	0,25
Streptococcus faecalis	DA 20	0,025
Streptococcus pyogenes (1)	DA 21	0,25

1) Caldo de infusión de sesos-corazón + 0,5 % de suero humano.

TABLA XXII

Actividad in vivo del R-451D

<u>Micro-organismos infectantes</u>	<u>Dosis del R-451D mg/ratón/día</u>	<u>Porcentaje de supervivencia después de 24 hr</u>
Streptococcus pyogenes	0 (solución salina testigo)	0
	75 (3,75 mg/kg)	50
	100 (5,0 mg/kg)	100
Staphylococcus aureus	250 (12,5 mg/kg)	50
	400 (20 mg/kg)	100
Diplococcus pneumoniae	75 (3,75 mg/kg)	50 (después de 2 días)
	100 (5,0 mg/kg)	100 (después de 2 días)

Para el R-451E, obtenido de acuerdo con el Ejemplo XVII, en la manera indicada con referencia al R-451A y R-451B, se determinó una actividad in vitro tal como se indica en la Tabla XXIII.

TABLA XXIII

Actividad in vitro del R-451E

<u>Concentración del R-451E µg/ml</u>	<u>Dimensiones de la zona de inhibición (mm) contra</u>		
	<u>Staphylococcus aureus</u>	<u>Streptococcus faecalis</u>	<u>Bacillus subtilis</u>
1000	20	19	24

100	15	13	19
10	8	9	15
1	0	0	8

5. Se muestra en la Tabla XXIV la actividad in vitro del SP-30 contra diversos micro-organismos gram-positivos (determinada como para la gentamicina aunque, siempre que no se indique lo contrario, en un medio nutritivo que consiste en caldo de triptosa-fosfato). La substancia utilizada para los ensayos respectivos se obtuvo del Ejemplo XIX (C) y tenía una potencia de 4.000 unidades de dilución por miligramo; es decir 1 mg de dicho material, cuando se disolvió en 1 ml de solvente y llevado a una dilución de 4.000 veces, todavía inhibe el crecimiento de Staphylococcus aureus (ATCC 6538P). Además, el SP-30 crudo como así también sus componentes individuales (fracciones) ha sido ensayado mediante la técnica común de ensayo en disco descrito con referencia a los R-451A y R-451B, contra ciertos organismos gram-positivos. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla XXV. La actividad in vivo contra ciertas infecciones bacterianas en los ratones se ensaya también como para la gentamicina. Se administra a los animales de ensayo el material precedente, del Ejemplo XIX (C), suspendido en carboximetil celulosa acuosa al 0,25 %; la dosis protectora para 100 % de los animales infectados con Staphylococcus aureus es 10 mg/ratón/día (= 40.000 unidades de dilución/ratón/día). La dosis protectora para 100 % de los animales infectados con Diplococcus pneumoniae es 15 mg/ratón/día (= 60.000 unidades de dilución/ratón/día), administrándose dicha dosis durante dos días. La toxicidad aguda (DL₅₀) de la misma muestra SP-30, se mide también en manera usual, en la forma de dosis de una suspensión

10.

15.

20.

25.

en carboximetil celulosa acuosa al 0,25 %, con los siguientes resultados:
subcutánea >7500 mg/kg ratón; intraperitoneal 7500 mg/kg
ratón; intravenosa 800 mg/kg ratón.

TABLA XXIV

Actividad in vitro del SP-30

Micro-organismos ensayados

	<u>Nombre sistemático</u>	<u>Designación de la cepa</u>	<u>Concentración inhibidora mínima (µg/ml)</u>
	Bacillus cereus var. mycoides	ATTC-7064	6,0
10.	Bacillus cereus var. mycoides	DA-39	0,75
	Bacillus cereus var. mycoides	DA-30	12,0
	Bacillus megatherium	DA-31	0,25
	Bacillus megatherium	DA-36	3,0
15.	Bacillus megatherium	DA-35	6,0
	Bacillus sphaericus	DA-32	2,0
	Bacillus sphaericus	DA-33	1,0
	Diplococcus pneumoniae	DA-999	0,075
	Staphylococcus albus	DA-40	0,75
20.	Staphylococcus aureus	ATCC-6538	0,25
	Staphylococcus aureus	ATCC-6538P	0,25
	Staphylococcus aureus	ATCC-12715	2,0
	Staphylococcus aureus	ATCC-1163	1,0
	Staphylococcus aureus	ATCC-9996	0,75
25.	Staphylococcus aureus var. Gray	-	0,25

	Staphylococcus aureus var. Smith	DA-141	0,25
	Staphylococcus aureus	DA-2026	0,25
5.	(Aislados clínicos re- sistentes a la penici- lina)	DA-2027	0,75
		DA-2028	1,5
		DA-2029	0,75
		DA-2030	2,0
		DA-2031	1,0
10.		DA-2032	0,75
		DA-2033	0,75
		DA-2034	0,75
		DA-2035	1,0
15.	Staphylococcus epi- dermis	DA-41	0,25
	Sarcina lutea	ATCC-9341	0,75
	Micrococcus flavus	DA-60	0,05
	Streptococcus pyogenes C	DA-21	0,025
	Streptococcus faecalis	ATCC-10541	16,0
20.	Escherichia coli	DA-110	16,0
	Escherichia intermedia	DA-111	2,0
	Mycobacterium smegmatis	DA-150	4,0
25.			

TABLA XXV

Actividad in vitro de los Antibióticos SP-30

Antibiótico	Conc. (μ g)	Zona de inhibición (mm) contra			
		Staphylococcus aureus	Streptococcus pyogenes	Bacillus subtilis	
5.	SP-30	1000	28	29	12
		100	19	19	(1)
		10	13	9	0
		1	9	0	0
10.	SP-30A	1000	28	31	9
		100	17	12	0
		10	(1)	0	0
		1	0	0	0
15.	SP-30B	1000	28	35	11
		100	20	20	8
		10	11	(1)	0
		1	0	0	0
20.	SP-30C	1000	28	33	14
		100	22	24	8
		10	17	14	0
		1	9	(1)	0
25.	SP-30D	1000	19	19	0
		100	13	10	0
		10	(1)	0	0
		1	0	0	0

1) Indica la existencia de una leve inhibición, difícil de ser expresada numéricamente.

Formas de Aplicaciones Farmacéuticas de los Antibióticos Precedentes

Los antibióticos, de acuerdo con la precedente invención para administración a los pacientes, se preparan en formas de dosis tales como las comúnmente utilizadas para los antibióticos. Para la preparación de dichas formas de dosis se puede utilizar portadores farmacéuticos usuales.

Los siguientes ejemplos describen dichas formas de dosis que contienen gentamicina (en la forma de su sulfato) como ingrediente activo. Es evidente que se puede reemplazar el sulfato de gentamicina por otros derivados de la gentamicina, por gentamicina libre, mediante otros antibióticos de acuerdo con la presente invención (inclusive sus derivados usuales), o por mezclas de dichos antibióticos y/o derivados.

EJEMPLO A

Injectable

Para la preparación de una inyectable apropiada, se disuelve 50 g de gentamicina (en la forma de su sulfato) en suficiente agua de inyección, y se completa la solución, así obtenida, con agua de inyección, hasta que se obtiene 1,0 lt de solución. Se filtra la solución a través de un filtro de retención bacteriana y se llena con ella asépticamente ampollas estériles. Se trata las ampollas en una autoclave a 121 °C durante 30 min.

EJEMPLO B

Ungüento Tópico

Se puede preparar un ungüento a partir de los siguientes ingredientes:

Gentamicina (como sulfato)	5,0 g
----------------------------	-------

p-hidroxi-benzoato de metilo	0,2 g
p-hidroxi-benzoato de butilo	1,8 g
Aceite mineral	100,0 g
Petrolato, c.s.	1 kg

5. Para preparar el ungüento, de los ingredientes precedentes, se funde el petrolato y se mezcla a 70-90 °C con el p-hidroxi-benzoato de metilo y de butilo. Después de haber sido todo disuelto, se deja enfriar la solución aproximadamente a 40 °C. Se dispersa separadamente el sulfato de gentamicina en el aceite mineral y se hace pasar la dispersión a través de un molino coloidal. Se agrega la dispersión molida a la base de ungüento, mencionada más arriba, y se deja enfriar la mezcla espontáneamente a la temperatura ambiente bajo condiciones de agitación. Se carga el producto en tubos o potes apropiados. El ungüento así obtenido puede utilizarse también como ungüento oftálmico.
- 10.

15. EJEMPLO C

Gotas Oftálmicas

Las gotas oftálmicas que contienen gentamicina se obtienen a partir de los siguientes ingredientes:

Gentamicina (como sulfato)	5,0 g
Alcohol fenil-etílico	5,0 g
Agua purificada, c.s.	1 lt

20. Para preparar las gotas, se disuelve el alcohol fenil-etílico en aproximadamente 90 % del agua, se disuelve luego el sulfato de gentamicina en la solución de alcohol fenil-etílico y se agrega suficiente agua para hacer que el producto alcance 1,0 lt. Se filtra la solución a través de un
- 25.

filtro de retención bacteriana y se carga asépticamente en botellas de goteo estériles.

N O T A

Descrito el invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de las demandas de patentes estadounidenses Nº 152.262 del 14 de noviembre de 1951, Nº 164.424 del 2 de abril de 1962, Nº 198.414 del 23 de mayo de 1962, Nº 211.193 del 16 de julio de 1962, Nº 211.154 del 16 de julio de 1962, y Nº 211.806 del 23 de julio de 1962, existiendo en todas ellas unidad de invención.

10. 1. Un procedimiento para la preparación de nuevos antibióticos en la manera biológica usual, en el que se usan micro-organismos de una de las especies *Micromonospora purpurea*, *M. schinoseri*, *M. carbonacea* y *M. halobutylia* o uno de sus mutantes o variantes, o de micro-organismos equivalentes, caracterizado por la aislación de dichos antibióticos con respecto al cultivo; y, si así fuera conveniente, su transformación en los derivados usuales, particularmente sus sales con ácidos, sus derivados N- y/o O-acilo y sus productos de reacción con compuestos de adición de bisulfito de aldehído o cetonas.

20. 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por la incubación aeróbica de los micro-organismos utilizados en medio nutritivo acuoso que contiene carbono y nitrógeno asimilables hasta que se produce por lo menos
- 25.

un compuesto que tiene una actividad antibiótica substancial.

5. 3. Un procedimiento para la preparación de nuevos antibióticos básicos de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por incubar una cepa, capaz de formar antibióticos básicos, de micro-organismos del género *Micromonospora*, hasta que se produjo por lo menos un compuesto que tiene actividad antibiótica substancial, y por el hecho de que se aísla las fracciones antibióticamente activas básicas del sustrato así obtenido y, si fuera conveniente, se las transforma a los derivados usuales, particularmente sales con ácidos o a productos de reacción con los compuestos de adición de bisulfite de aldehidos, de preferencia formaldehido, o cetonas.
10. 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por el uso de micro-organismos de una de las especies *M. purpurina* y *M. achinospora*, o de micro-organismos equivalentes tales como las variantes *M. achinospora* var. *ferruginosa* y *M. achinospora* var. *pellida*, para la preparación del nuevo antibiótico gendamicina y/o de sus antibióticos reproducidos BA-3 (fracciones A y B) en la manera biológica usual; la aislación y, si así fuera conveniente, purificación de por lo menos uno de estos antibióticos a partir del cultivo; y si así fuera conveniente, la transformación a sus mencionados derivados.
15. 5. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado por el uso de una cepa productora de gendamicina, de preferencia una de las cepas NRRL 2955,
- 20.
- 25.
- 30.

NRRL 2985, NRRL 2995 y NRRL 2996.

5. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 4 e 5, caracterizado por el hecho de que, después de la formación de un producto con actividad antibiótica sustancial, se extrae con ácido el micelio del cultivo y se aísla la gentamicina y/o sus antibióticos coproducidos a partir del extracto ácido por adsorción, por precipitación de sales fraccionadas o por una combinación de dichos dos métodos.

15. 7. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 e 2, caracterizado por el uso de *M. garbanosana*, o de micro-organismos equivalentes tales como la variante *M. garbanosana* var. *aurantiana*, para la preparación del nuevo antibiótico R-451 en la manera biológica usual; la ciclación, y si así fuera conveniente, purificación de por lo menos uno de sus componentes R-451A, R-451B, R-451C, R-451D y R-451E a partir del cultivo; y, si así fuera conveniente, la transformación en derivados usuales, particularmente a los derivados N- y/o O-acilo tales como el acetato del componente R-451-D.

20. 8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 7, caracterizado por el uso de una cepa productora de R-451, de preferencia de una de las cepas NRRL 2972 y NRRL 2997.

30. 9. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 e 2, caracterizado por el uso de *M. halobutlica*,

5. e de micro-organismos equivalentes, para la preparación del nuevo antibiótico SP-30 en la manera biológica usual; la aislación y, si así fuera conveniente, purificación de por lo menos uno de sus componentes SP-30A, SP-30B, SP-30C y SP-30D a partir del cultivo; y, si así fuera conveniente, la transformación a los derivados usuales.

10. 10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 9, caracterizado por el uso de una cepa productora de SP-30, de preferencia de la cepa NRRL 2998.

15. 11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado por el hecho de que, después de la formación de un producto con actividad antibiótica substancial, se separa el micelio con respecto al cultivo, se extrae el caldo restante con un solvente inmiscible en agua, y se aísla del extracto así obtenido los antibióticos desecados o sus mezclas por adsorción, por 20. partición, por precipitación fraccionada o por una combinación de dichos métodos.

25. 12. Un procedimiento para la preparación de nuevos antibióticos.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de 114 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

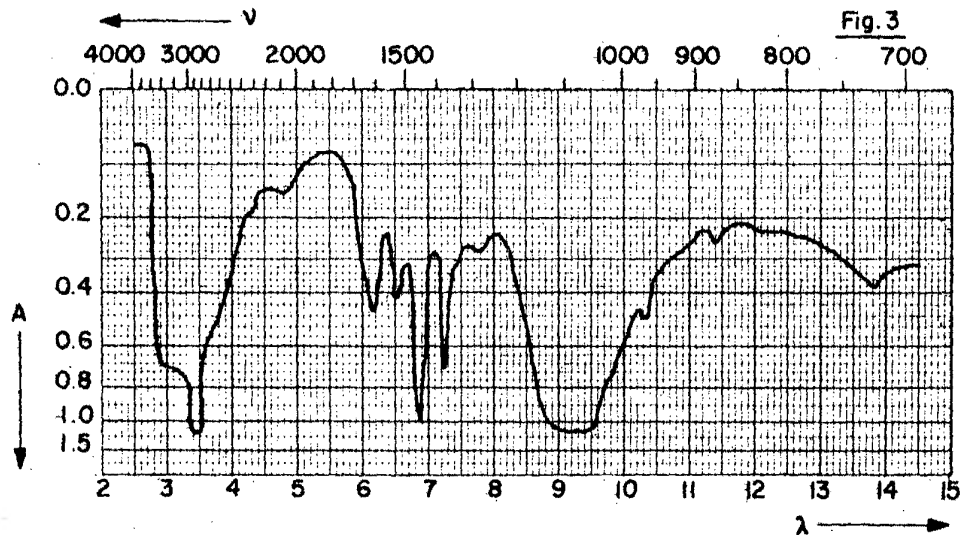
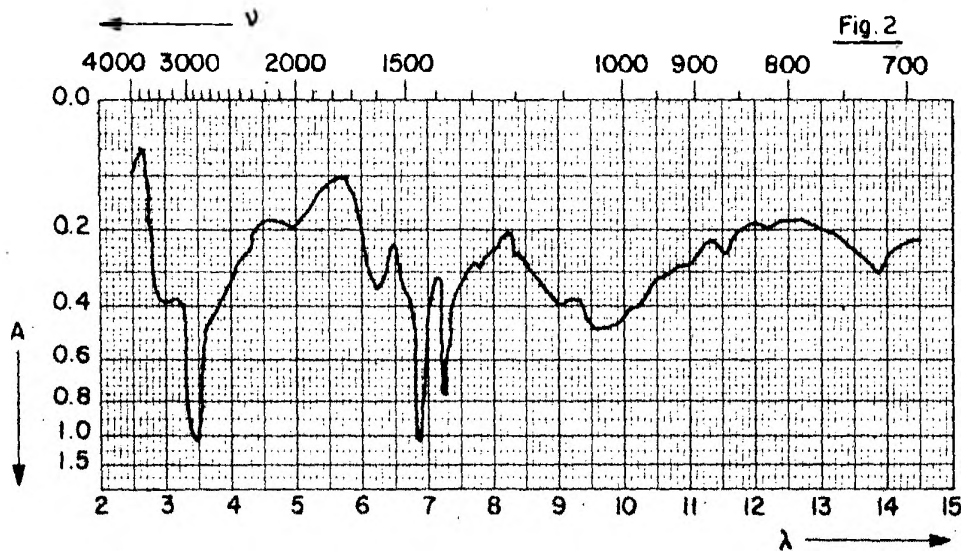
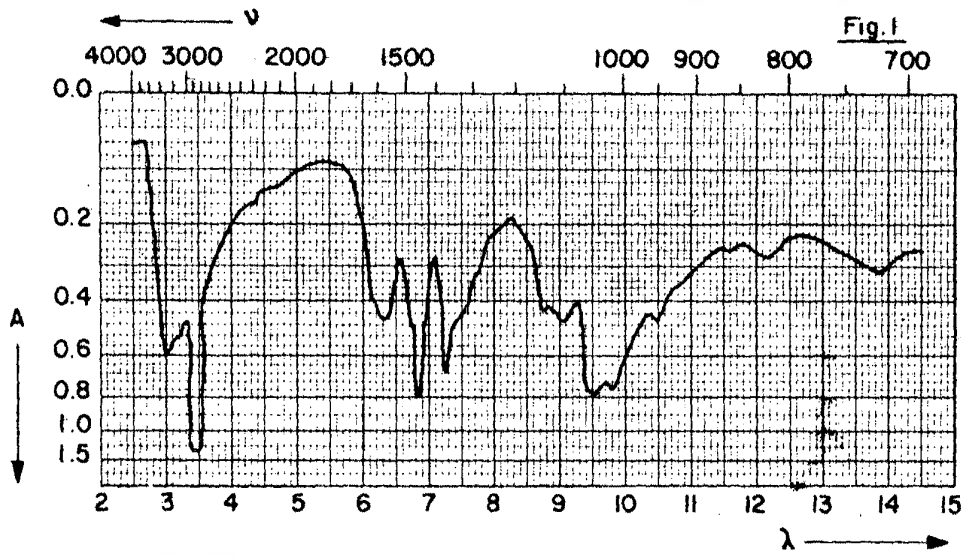
Madrid, a 13 de Noviembre de 1962.

SCHERING LTD.

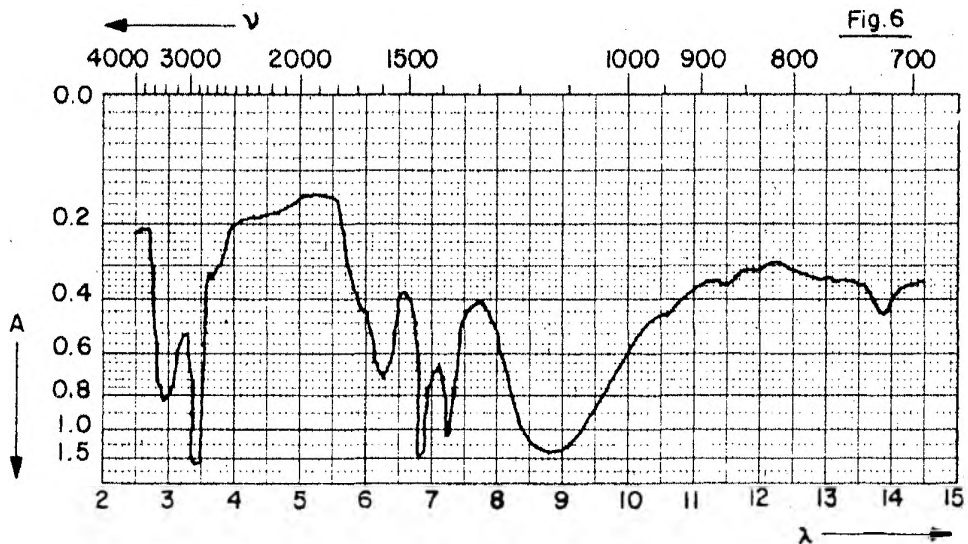
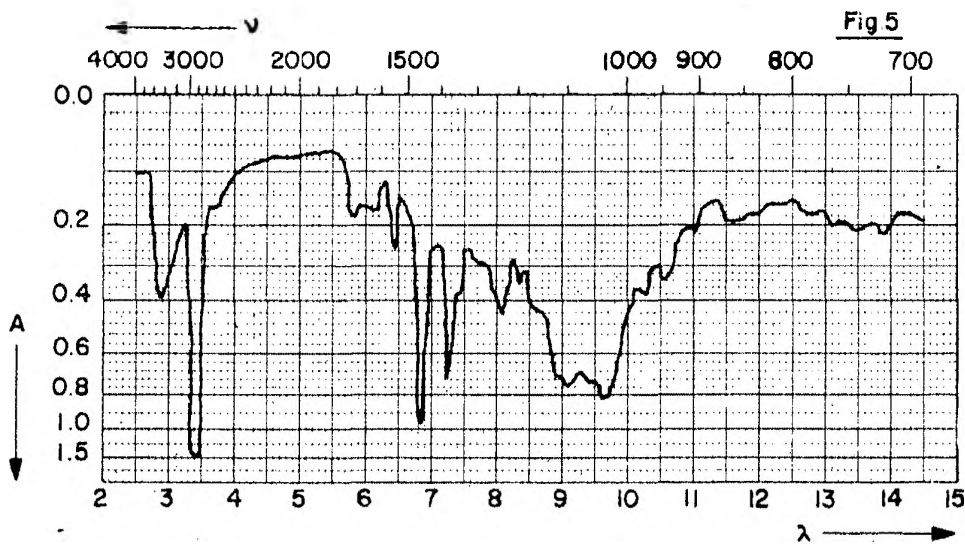
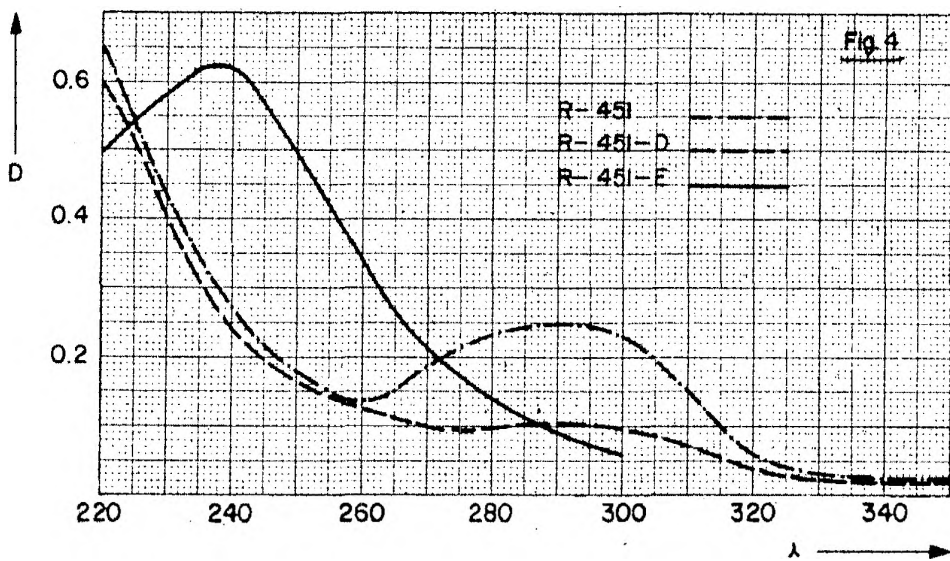
p.a.

JAMES IZERN MIRALLES

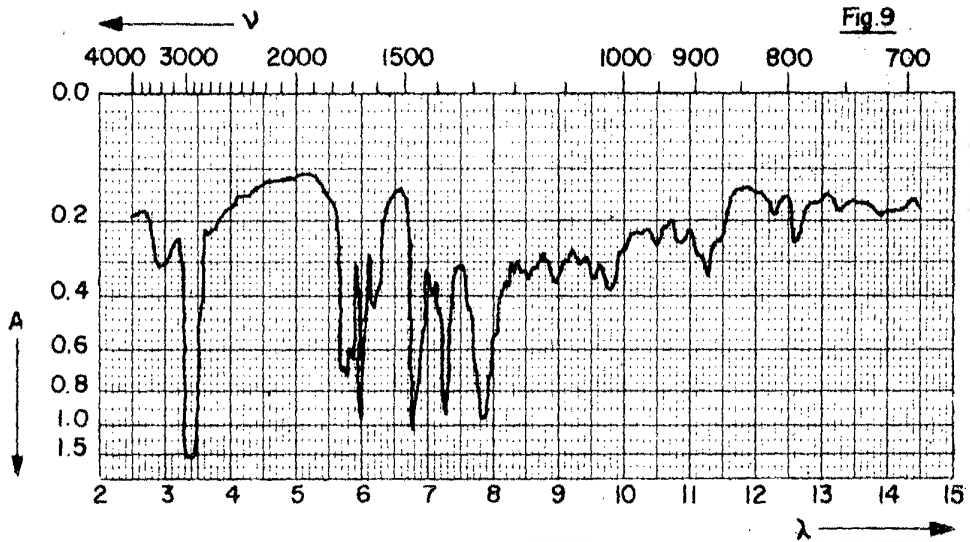
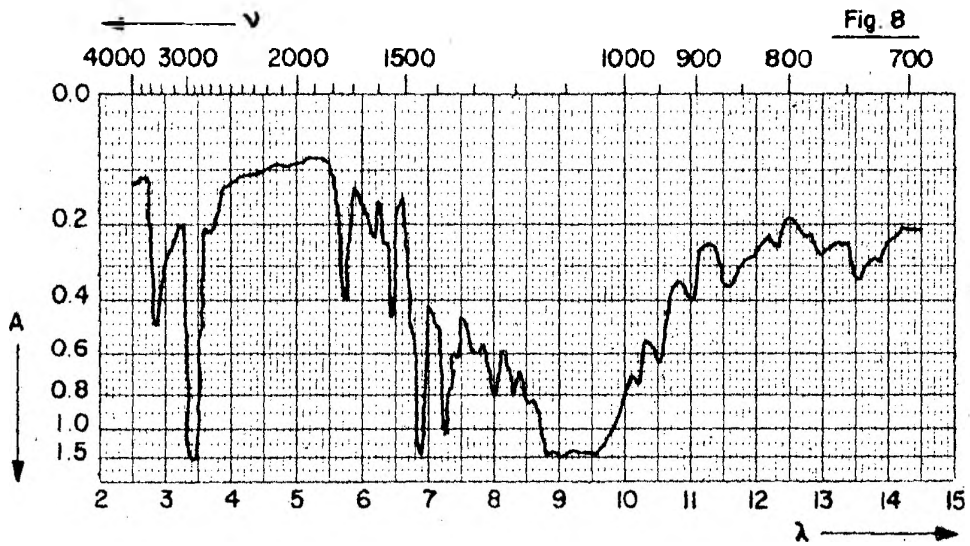
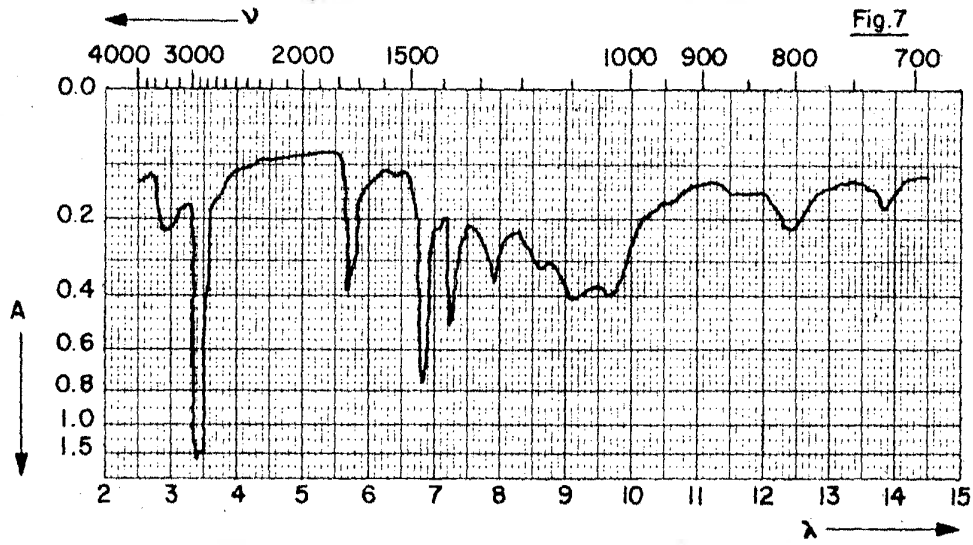
p.p.



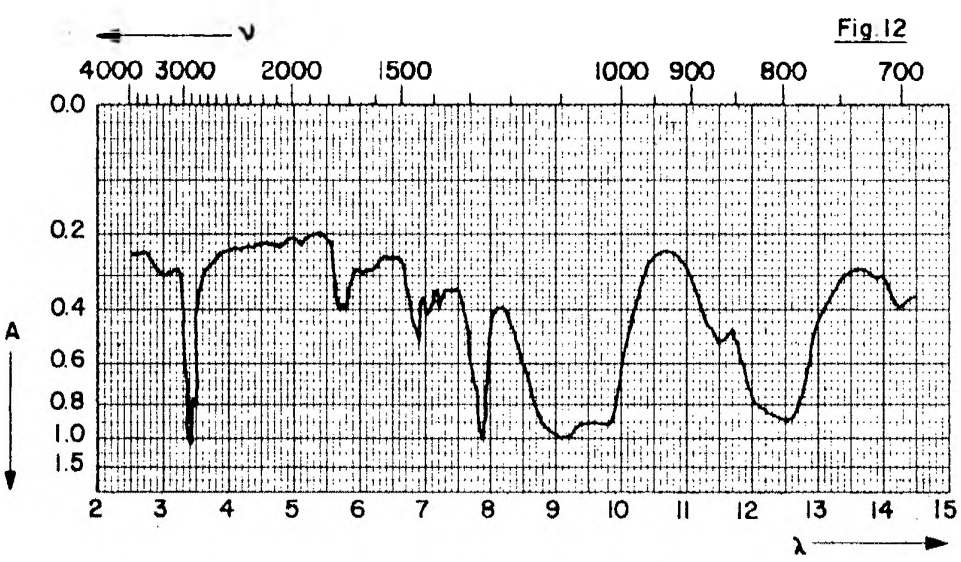
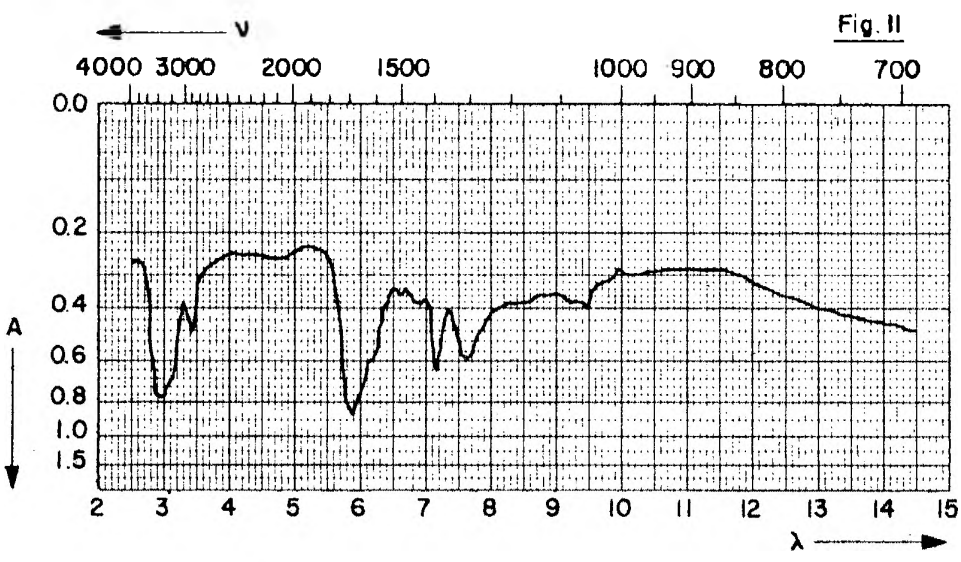
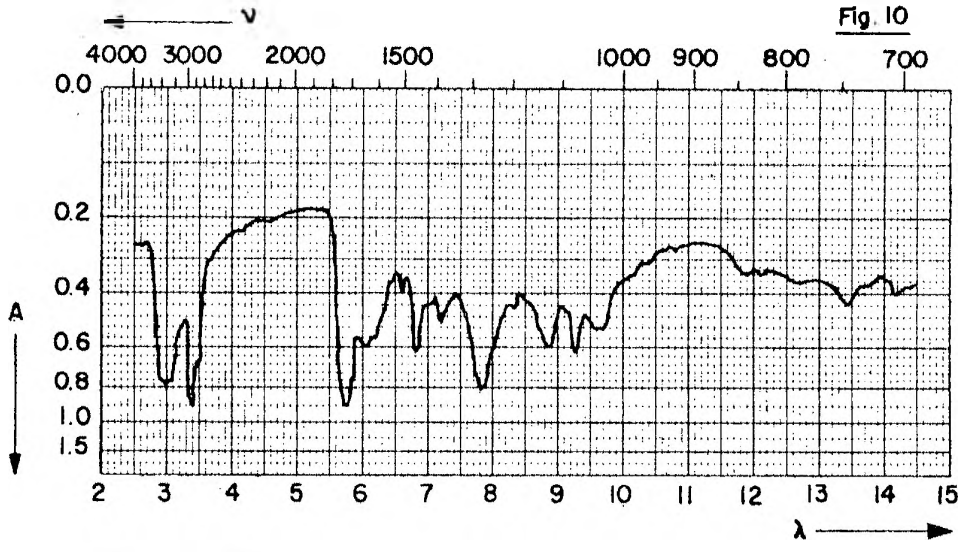
Modificado 13 NOV 1962
P.P. Jaime Lsern
C.A.C.M.V.



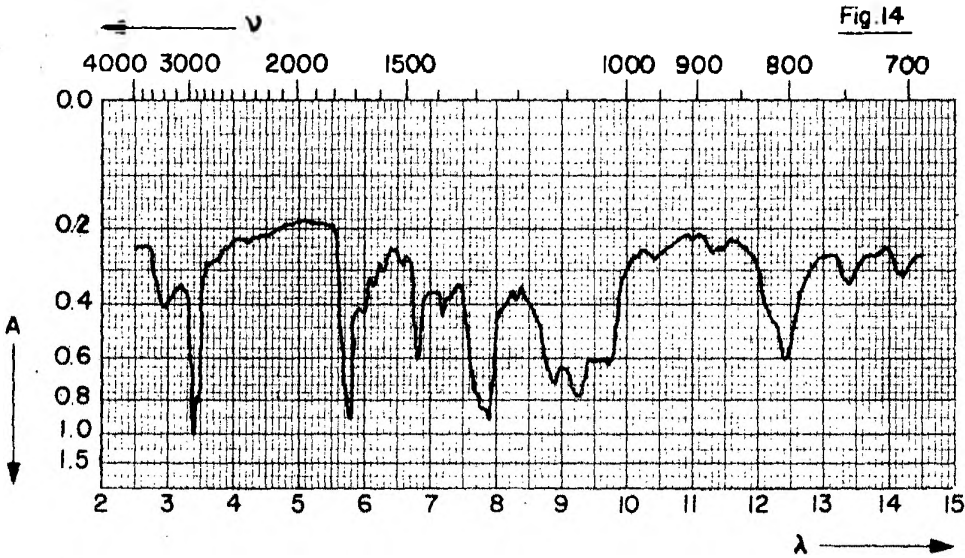
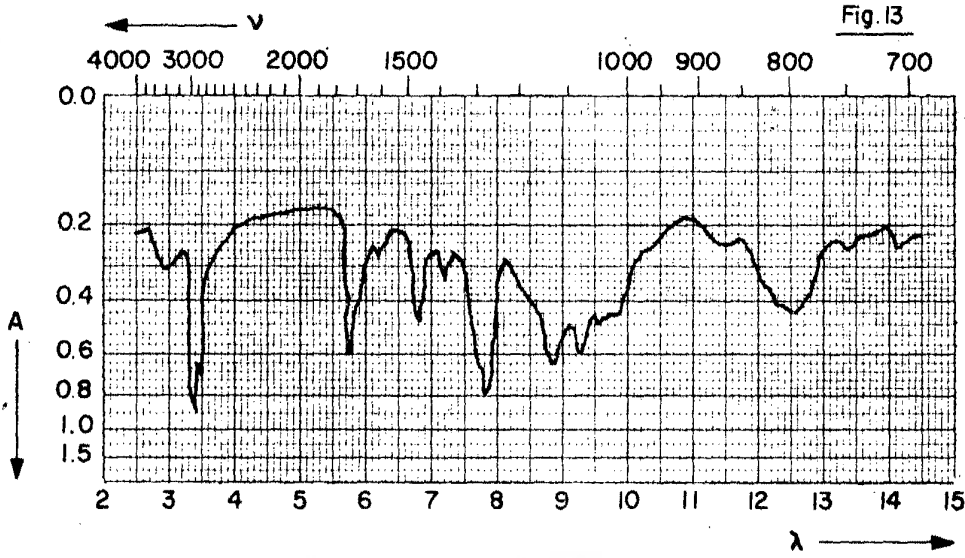
Madrid, 15 NOV 1952
J. Jaime Isern
S. P. *[Signature]*



Madrid, 13 MAR 1954
P.P. Jaime Isern
2004



Madrid, Jaime Isern
D. D. [illegible]



13 NOV 1962

Madrid, Jaime Xern
D. D.
Xern