

PATENTE DE INVENCION

SC 2387-ANTIBIOTIQUE 11.837 R.P.

**304196**

*Memoria Descriptiva*

*sobre:*

"Procedimiento de preparación de antibióticos"

-----

*Solicitante:* RHONE-POULENC, S.A., entidad francesa,  
residente en 22 Avenue Montaigne,  
PARIS 8<sup>e</sup>, Francia.

-----

Este invento se refiere a un nuevo anti-  
biótico designado a continuación por el número  
11.837 R.P. y a su procedimiento de preparación.  
Este nuevo producto ofrece un interés muy espe-  
cial a causa de su actividad antibacteriana eleva-

5.

304196

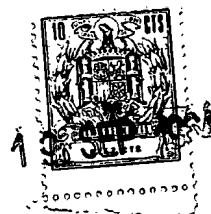
-2-



1934

- da, con respecto a los gérmenes gram-positivos, y de su elevada duración de acción. Puede obtenerse partiendo de medios de cultivo artificial de un micro-organismo identificado más completamente a
5. continuación, perteneciente al género streptomyces, y designado por la denominación "Streptomyces viridans DS 9466" (NRRL 3087).
- El antibiótico 11,837 R.P. es muy soluble en el agua, soluble en el metanol, la piridina
10. el ácido acético, la dimetilformamida, poco o nada soluble en el etanol, la acetona, el cloroformo y el hexano normal.
- En solución acuosa, el 11,837 R.P. es muy estable de pH 5 a pH 10 (conserva el 90% por
15. lo menos de su actividad después de dos semanas a 37°), moderadamente estable al pH 4 (pérdida de 30% de actividad en dos semanas a 37°) y relativamente inestable al pH 2 (pérdida del 70% de su actividad en 6 días a 37°).
20. El 11,837 R.P., dá ensayos o resultados negativos en las reacciones siguientes: reacción del biuret, reacción con cloruro férrico, reacción con la ninhidrina. Proporciona ensayos o resultados positivos en las reacciones siguientes: reacción con la ninhidrina después de hidrólisis ácida,
25. reacción de diazotiazación, reacción xantoproteica, reacción con nitrato de plata amoniacal, (dudosa antes de la hidrólisis, y muy enérgica después de hidrólisis ácida), reacción con floroglucina, reacción con carbazol, reacción con permanganato de po-
- 30.

304196



-3-

tasio, reacción de Benedict después de hidrólisis ácida. Colora en anaranjado el ácido sulfúrico concentrado y en rosa pálido el ácido clorhídrico concentrado.

5. El 11,837 R.P. es un ácido fuerte cuyo equivalente neutro medido por titulación potenciométrica a la sosa, es igual a 600 ( $pK_a = 4,1$ ). Su peso molecular parece superior a 5000 ya que no dializa a través de una membrana de celulosa regenerada (tipo celofana).

10. El antibiótico 11,837 R.P. contiene carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo. Su composición elemental (deducida del análisis de su sal sódica) es próxima a:

15.  $C \% = 46,9$   $H \% = 7,9$   $O \% = 39,2$   $N \% = 3,9$   $P \% = 2,25$

Se caracteriza por las propiedades físicas siguientes:

Aspecto: polvo amorfo blanco.

Punto de fusión: sin fusión clara, se descompone desde  $160^\circ$ .

20. Espectro infra-rojo (determinación a partir de comprimido en mezcla con KBr).

25. Este Espectro se representa por la fig. 1 en la que se han tomado como abscisas, por una parte, las longitudes de onda expresadas en micrones (escala inferior) y por otra parte los números de ondas en  $cm^{-1}$  (escala superior) y como ordenadas, las transmisiones en %.

30. En la Tabla 1 se indican las principales bandas de absorción infra-roja para este pro-

304196

-4-

19



ducto:

T A B L A I

3360 tF	1164 m
2930 F	1125 ép
1720 F	1100 m tF = muy fuerte
1630 tF	1068 tF F = fuerte
1564 m	1040 tF m = media
1550 F	968 m f = débil
1430 ép.	950 m ép. = espaldón
1400 ép.	890 f
1380 F	860 f
1330 m	800 f
1222 F	

La sal sódica del 11,837 R.P., tiene la composición elemental siguiente:

C % = 45,0 H % = 7,4 O % = 37,6 N % = 3,72  
P % = 2,16 y Na % = 4,15

Se caracteriza por las propiedades físicas siguientes:

5. Aspecto: polvo amorfo, prácticamente blanco.

Poder rotatorio o rotación específica:

$$(\alpha)_D^{22} = 6^\circ \pm 1 \quad (c = 0,6, \text{ agua})$$

Espectro ultra-violeta (determinación partiendo de una solución de 30 mg/l en agua).

fin de absorción:  $E \frac{1}{l} \% = 30$  a 220 m $\mu$  y  
3,5 a 257 m $\mu$

10. Espectro infra-rojo (determinación partiendo de comprimidos en mezcla con KBr).

Este espectro se representa por la fi-

304196



-5-

- gura 2, en la que se han tomado como abscisas, por una parte las longitudes de ondas expresadas en micrones (escala inferior) y por otra parte los números de ondas en  $\text{cm}^{-1}$  (escala superior) y como ordenada, las transmisiones en %.
- 5.

En la tabla II se indican las principales bandas de absorción para este producto.

T A B L A II

	3400 tF	1160 m	
10.	2910 F	1100 m	tF = muy fuerte
	1730 tF	1062 tF	F = fuerte
	1547 m	1042 ép	m = media
	1525 F	1030 ép.	f = débil
	hacia 1430 ép	972 m	ép = espaldón
15.	1378 F	947 m	
	1330 m	890 f	
	1238 m	860 f	

- La actividad bacteriostática del 11,837 R.P. con respecto a un cierto número de gérmenes, se ha determinado por uno de los métodos de dilución corrientemente empleados para este objeto. Para cada germen, se ha determinado la concentración menor de substancia que, en condiciones definidas, impide todo desarrollo visible en un caldo nutritivo adecuado. Los resultados de las distintas determinaciones, están reunidos en la Tabla III en la que las concentraciones bacteriostáticas mínimas se expresan en microgramos de substancia por  $\text{cm}^3$  de medio de ensayo.
- 20.
- 25.

30. Estas distintas determinaciones indi-

304196



-6-

- can que la actividad del 11,837 R.P., se ejerce principalmente sobre los gérmenes que toman la coloración de Gram; su actividad sobre *Streptococcus hemolyticus* es especialmente elevada. Es relativamente poco activo sobre gérmenes Gram-negativos, aunque sus actividades sobre *Neisseria catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Brucella abortus bovis* sean apreciables. No acusa resistencia cruzada alguna con los antibióticos siguientes : penicilina, estreptomycin, tetraciclina, cloramfenicol, espiramicina, carbomicina, eritromicina, pristinamicina y novobiocina. Los resultados de distintas determinaciones de las concentraciones bacteriostáticas del 11,837 R.P. frente a distintas cepas de estafilococo, que indican una resistencia a uno o más de los antibióticos mencionados anteriormente están reunidos en la Tabla IV en la que figuran, a título de recuerdo, las concentraciones bacteriostáticas relativas a las tres cepas de esta-filococo sensibles a todos estos antibióticos y que figuran en la Tabla III.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

304196



-7-

T A B L A III

Organismos bacterianos ensayados	Concentraciones bacteriostáticas mínimas (en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )
Staphylococcus aureus, cepa 209 P-ATCC 6538 P	0,15
Staphylococcus aureus, cepa 133 (Instituto Pasteur)	0,15
Staphylococcus aureus, cepa Smith	0,35
Sarcina lutea - ATCC 9341	150
Streptococcus faecalis - ATCC 9790	50
Streptococcus viridans - (Instituto Pasteur)	0,6
" pyogenes hemolyticus(cepa Dig 7, Instituto Pasteur)	0,005
Neisseria gonorrhoeae (A 50 - Instituto Pasteur)	1,25
Diplococcus pneumoniae (cepa Til, Instituto Pasteur)	0,03
Bacillus subtilis - ATCC 6633	3
Bacillus cereus - ATCC 6630	0,03
Mycobacterium species - ATCC 607	35
Mycobacterium para-smegmatis (A 75 - Lausanne)	65
Escherichia coli - ATCC 9637	35
Shigella dysenteriae - Shiga L (Instituto Pasteur)	40
Salmonella paratyphi A (Lacasse, Instituto Pasteur)	55
Salmonella schottmuelleri (paratyphi B) Fougenc (Instituto Pasteur)	30
Proteus vulgaris - A 244	165
Klebsiella pneumoniae - ATCC 10.031	60
Pseudomonas aeruginosa (cepa Bass - Instituto Pasteur)	40
Brucella bronchiseptica (CN-387 - Instituto Wellcome)	9
Brucella abortus bovis B 19	2,5
Pasteurella multocida (A 125, Instituto Pasteur)	1,5
Tréponéma de Reiter	20

304196

19



-8-

T A B L A IV

Cepas ensayadas (Staphylococcus aureus)	Concentraciones bacteriostáticas mínimas(en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )
-cepa 209 P-ATCC 6538 P (s)	0,15
-cepa 209 P hecha resistente a la espiramicina	0,2
-cepa 209 P hecha resistente a la carbomicina	0,15
-cepa 209 P hecha resistente a la pristinamicina	0,25
-cepa 209 P hecha resistente a la novobiocina	0,1
-cepa 133 (Instituto Pasteur) (s)	0,15
-cepa Smith (s)	0,35
-cepa B <sub>3</sub> (resistente a la penicilina y a la estreptomicina)	0,2
-cepa Hb (resistente a la penicilina y a la tetraciclina)	0,3
-cepa Beaujon 3 (resistente a la penicilina, a la estreptomicina, a la tetraciclina y al cloramfenicol)	0,3
-cepa MB I (resistente a la penicilina y a la eritromicina)	0,1
-cepa Lavault (resistente a la penicilina, a la eritromicina y a la espiramicina)	0,1

304196



-9-

La actividad antibacteriana del 11,837 R.P. se ha confirmado "in vivo" en los animales de laboratorio infectados experimentalmente por gérmenes tales como estreptococos, neumococos, estafilococos y Neisseria (N. meningitidis). Es especialmente activo en el ratón por vía parenteral; la actividad por vía intra-venosa es dos veces mayor que por vía sub-cutánea.

10. Posee una gran duración de acción, lo que le concede una actividad preventiva muy buena. Esta acción preventiva se ha demostrado con respecto a infecciones estafilococica y estreptococica de ratón. Así por ejemplo, a la dosis de 250 mg/kg, intra-venosa, el 11,837 R.P. protege todos los ratones con respecto a una infección i.p. por estreptococo, desarrollada 56 días después de la administración única del producto. A la misma dosis (250 mg/kg) pero por vía sub-cutánea, la benzatina-penicilina G, protege solamente los ratones durante 24 horas.

15. La toxicidad del 11,837 R.P. se ha estudiado principalmente en el ratón. La dosis letal 50%, o  $DL_{50}$  se ha determinado por vías sub-cutánea e intra-venosa.

$$DL_{50} = 1,7 \text{ g/kg s.c.}$$

25. 
$$= 1,5 \text{ g/kg i.v.}$$

Estos resultados muestran que el producto es muy poco tóxico.

El organismo productor del antibiótico 11,837 R.P. pertenece al género streptomyces y se designa por la denominación "Streptomyces viridans"

30.

304128



-10-

DS 9466". Se ha depositado en el laboratorio del N R R L de Peoria, Ill. (U.S.A.) bajo la referencia "N R R L 3087".

5. Este organismo se ha aislado de un fragmento de tierra recogido cerca de Madras, en la India.

El método de aislamiento es el siguiente:

10. La tierra recogida se pone en suspensión en agua destilada estéril ; luego la suspensión se diluye a distintas concentraciones; un pequeño volumen de cada dilución se dispone en la superficie de cajas de Petri, que contienen un medio nutritivo geloso.

15. Después de una incubación de algunos días a 26°, las colonias de microorganismos que se quieran aislar, se trasplantan a gelosas inclinadas, con objeto de obtener cultivos más abundantes.

20. Siguiendo la clasificación del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7ª edición (1957) para el género streptomyces, así como la clasificación y las descripciones indicadas por S.A. Waksman, en "The Actinomycetes", The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1961, se comprueba que los
25. caracteres morfológicos del organismo productor de 11,837 R.P. corresponden a los descritos para el Streptomyces viridans. Por esta razón, el organismo productor de 11,837 R.P., se ha considerado como perteneciente a esta especie, y se ha denominado
30. Streptomyces viridans DS 9466.

304196



-11-

En la Tabla V, los caracteres de la cepa *Streptomyces viridans* DS 9466, se indican paralelamente a la descripción de la especie *Streptomyces viridans* tal como se dan en "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7ª Edición (1957) (The Williams and Wilkins Co. Baltimore). Esta comparación muestra perfectamente que el organismo productor de 11,837 R.P. tiene caracteres de acuerdo con los descritos para el *Streptomyces viridans*; las ligeras diferencias existentes, solo pueden aplicarse a cepas diferentes de una misma especie.

5.

10.

15.

20.

25.

El *Streptomyces viridans* DS 9466 posee la propiedad de producir, en ciertos medios de cultivo, en especial en el medio de Bennett, un pigmento soluble verde que, al principio de su producción y cuando se produce en cantidad suficiente, tiene una coloración verde esmeralda intensa. Esta producción de pigmento verde esmeralda es bastante caprichosa y depende, en especial, de la intensidad de la siembra del microorganismo en los medios en que se produce; se favorece por la presencia de tierra; el verde que presenta el substrato no se conserva intacto y a medida del envejecimiento del cultivo, vira según los medios de cultivo y según la cantidad producida, al verde oscuro o verde parduzco o pardo grisáceo.

304196

-12-

## T A B L A V



	Streptomyces viridans (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7 <sup>a</sup> Edición, p.758-759)	Streptomyces viridans DS 9466
Crecimiento vegetativo	Colonias verdes a pardo verde	Micelio vegetativo amarillo grisáceo a amarillo vivo o amarillo parduzco. En determinados medios, se tñe de una coloración verde que evoluciona hasta el pardo verde o el verde negruzco en las zonas en que se produce pigmento verde soluble.
Micelio aéreo	Gris intenso, coloreado en oliva o gris verde, aterciopelado, que recubre toda la colonia. Esporóferos largos, que forman espirales. Esporas cilíndricas.	Gris claro a gris oscuro, polvoroso, bien desarrollado. Esporóferos largos monopodios, terminados por cadenas de esporas insertadas en manojos terminales; susceptibles de presentar ramificaciones a lo largo de su vástago principal. Cadenas de esporas flexuosas o que forman espirales cortas. Esporas cilíndricas.
Gelatina	Licuefacción rápida.	Licuefacción moderada.
Gelosa	Crecimiento pardo verde. Producción de pigmento soluble pardo	Crecimiento vegetativo amarillo o de parduzco a pardo verde, según los medios. Pigmento soluble nulo o parduzco; además, según los casos, producción facultativa y más o menos regular de pigmento soluble verde.
Gelosa sintética	Colonias verdes. Producción de pigmento soluble verde.	Micelio vegetativo amarillento a parduzco, tiñéndose de verde cuando se produce pigmento verde soluble. Pigmento soluble nulo o de amarillento a parduzco, lo más a menudo poco intenso. En ciertos casos, producción de pigmento soluble verde en pequeña cantidad (gelosa glicerina-esparraquina, gelosa al almidón Waksman) o más abundante (gelosa de Czapek a la glicerina); en este último caso, se ha observado la influencia favorable de la presencia de tierra.

304196

-13-



	Streptomyces viridans	Streptomyces viridans DS 9466
	(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7ª Edición, p.758-759)	
Leche	Coagulada y rápidamente peptonizada.	Peptonización lenta, no precedida de coagulación a 25º, con una ligera coagulación a 37º.
Sacarosa	Rápidamente invertida.	Pobrementemente utilizada.
Almidón	Rápidamente hidrolizado.	Bastante rápidamente hidrolizado.
Celulosa	Crecimiento pobre	Crecimiento positivo.
Nitritos	Activamente producidos a partir de los nitratos.	Rápida y enérgicamente producidos, a partir de los nitratos.
Propiedades antagónicas	Ninguna	Productor de 11,837 R.P.

304196

19



-14-

El Streptomyces viridans DS 9466 presenta

- un conjunto aéreo esporulado de color gris bastante oscuro, bien desarrollado en un cierto número de medios de cultivo corrientes, en especial el medio de Bennett. Forma esporas cilíndricas que miden de 0,7 a 0,9  $\mu$  de ancho y de 1,3 a 1,5  $\mu$  de longitud. Sus esporóferos son de inserción monopodia; forman, bastante frecuentemente, un conjunto ramificado de organización complicada. Algunos filamentos esporíferos llevan una cadena única de esporas, pero frecuentemente el filamento aéreo se termina por un manojo o haz de varios filamentos esporíferos, muy a menudo, de 2 a 4, insertados en el mismo punto en su extremo; uno o varios de los filamentos insertados en el extremo del filamento principal, pueden dividirse eventualmente a su vez, en su parte terminal, para formar ellos también nuevos grupos de 2 a 4 cadenas de esporas. A lo largo del filamento principal y de los filamentos secundarios, se observan a menudo ramificaciones formadas bien por un solo filamento esporífero terminado por una cadena única de esporas, o bien por un solo filamento terminado por varias cadenas de esporas insertadas en su punto terminal, o bien, algunas veces, por 2 a 3 filamentos esporíferos insertados en el mismo punto y que contienen o no ramificaciones terminales. Las cadenas de esporas son flexuosas con terminaciones sencillamente recurvadas o enrolladas describiendo una o más vueltas helicoidales que forman hélices generalmente abiertas.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



- Los caracteres de cultivo y las propiedades bioquímicas del *Streptomyces viridans* DS 9466, se han examinado en las gelosas nutritivas y en los caldos nutritivos corrientemente utilizados para examinar el aspecto de las cepas de streptomycetes. Las observaciones realizadas figuran en la Tabla VI adjunta; salvo indicaciones precisas, se refieren a cultivos de 2 a 4 semanas a 26°, llegadas a un buen estado de desarrollo. La mayor parte de los medios de cultivo empleados, se han preparado de acuerdo con las fórmulas indicadas en "The Actinomycetes" S.A. Waksman, p. 193-197, Chronica Botánica Co., Waltham Mass., E.U. de A. 1950; en este caso, se indican por la letra W seguida por el número que se les ha atribuido en "The Actinomycetes";
- Las referencias ó composiciones de los demás medios de cultivo, son las siguientes:
- Referencia A - K.L. JONES - Journal of Bacteriology, 57, 142, (1949).
- Ref. B - A.M. WILLIAMS et E.Mc. COY - Applied Microbiology, I, 307, (1953).
- Ref. C - GRAUNDY et col. - Antibiotics and Chem. 2, 401, (1952).
- Ref. D - Peptona 0,5 % Extracto de carne 0,3 % Tiro-sina 0,5 % Gelosa 2 %.
- Ref. E - Sales inorgánicas - Almidón Agar - T.G. PRIDHAM y otros. Antibiotics Annual, 1956 - 1957, p. 947-953.
- Ref. F - Corresponde a la fórmula W-1, en la que 30 g de sacarosa se substituyen por 15 g de glicerina.



5. Ref. - "plain gelatin" - Preparada según las indicaciones del "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" de la Society of American Bacteriologists, Geneva, N.Y. - 1150 - 18.
10. Ref. H - Manual of Methods fur Pure Culture Study of Bacteria - Society of American Bacteriologists, Geneva, N.Y., 1150 - 18.
10. Ref. I - Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria - Society of American Bacteriologists, Geneva, N.Y., 1150 - 19.
15. Ref. J - Corresponde a la fórmula W-18 en la que la sacarosa se suprime y se substituye por pequeñas tiras de papel de filtro sumergidas parcialmente en el líquido.
20. Ref. K - Leche desnatada en polvo comercial, reconstituída según las indicaciones del fabricante.
20. Ref. L - H.D. TRESNER et F. DANGA - Journal of Bacteriology, 76, 239-244, (1958).
25. Siguiendo el principio del método de Fridham y Gottlieb - (J. of Bact. 56, 107-114, 1948), el *Streptomyces viridans* DS 9466 utiliza bien, como orígenes de carbono, los elementos siguientes: xilosa, arabinosa, ramnosa, glucosa, galactosa, levulosa, manosa, lactosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, destrina, almidón, inulina, eritrita, adonita, dulcita, sorbita; la utilización de la sacarosa es débil y lenta, casi nula en
30. 10 días y solo permite un desarrollo pobre en un mes.



5. El procedimiento de preparación del antibiótico 11,837 R.P. consiste esencialmente en cultivar *Streptomyces viridans* DS 9466 o sus "mutantes" en un medio y en condiciones adecuadas, y en separar inmediatamente el antibiótico formado en el transcurso del cultivo.

10. El cultivo de *Streptomyces viridans* DS 9466 puede realizarse por cualquier método de cultivo aerobio, en superficie o en profundidad, pero se prefiere este último por razones de comodidad. Para este objeto se utilizan los distintos tipos de aparatos actualmente en uso corriente en la industria de las fermentaciones.

15. En especial, puede adoptarse la marcha siguiente para el desarrollo de las operaciones:

*Streptomyces viridans* DS 9466 - provisión

↓  
cultivo en gelosa

↓  
cultivo en ampolla

↓  
cultivo "inoculum" en fermentador

20. ↓  
cultivo de producción en fermentador

25. El medio de fermentación ha de contener esencialmente un origen de carbono y un origen de nitrógeno asimilables, elementos minerales y, eventualmente, factores de crecimiento; todos estos elementos pueden introducirse en forma de productos bien definidos, o por mezclas complejas tales como se encuentran en productos biológicos de



orígenes diversos.

5. Como origen de carbono asimilable, pueden utilizarse hidratos de carbono tales como la glucosa, la sacarosa, la lactosa, las dextrinas, el almidón, las melazas u otras sustancias hidrocarbura-
10. das, como los azúcares alcoholes; manitol ... o como ciertos ácidos orgánicos: ácido láctico, cítrico, tártrico ... Algunos aceites animales o vegetales, tales como el aceite de "manteca" o el aceite de soja pueden substituirse ventajosamente estos distintos orígenes hidrocarbura-

15. Los orígenes convenientes de nitrógeno asimilable, son extremadamente variados. Pueden ser sustancias químicas muy sencillas, tales como los nitratos, las sales minerales y orgánicas de amonio, la urea, los aminoácidos. Pueden introducirse también mediante sustancias complejas que contengan principalmente el nitrógeno en forma "protídica": caseína, lactoalbúmina, glutén y sus hidrolizados,
20. harinas de soja, de araquís, de pescado, extractos de carne, de levadura, "distillers solubles", "corn-steep".

25. Entre los elementos minerales agregados, algunos pueden tener un efecto amortiguador o de neutralización como los fosfatos alcalinos o alcalino-térreos o los carbonatos de calcio y de magnesio.

30. Otros aportan el equilibrio iónico necesario para el desarrollo del *Streptomyces viridans* DS 9466 y para la elaboración del antibiótico,



como los cloruros y sulfatos de los metales alcalinos y alcalino-térreos. Finalmente, algunos actúan más especialmente como activadores de las reacciones metabólicas del *Streptomyces viridans* DS 9466; son las sales de cinc, de cobalto, de hierro, de cobre, de manganeso.

5.

El pH del medio de fermentación al principio del cultivo, ha de estar comprendido entre 6 y 7,8, con preferencia, de 6,5 a 7,5. La temperatura óptima para la fermentación es de 25 a 28°, pero se obtiene una producción satisfactoria para temperaturas comprendidas entre 23° y 35°. La aireación de la fermentación puede variar entre valores bastante grandes. Se ha observado, sin embargo, que aireaciones de 0,3 a 2 litros de aire, por litro de caldo y por minuto, son especialmente convenientes. El rendimiento máximo de antibiótico, se obtiene después de 4 a 7 días de cultivo; este tiempo depende esencialmente del medio utilizado.

10.

15.

20.

De acuerdo con lo anterior, se concibe que las condiciones generales del cultivo de *Streptomyces viridans* DS 9466 para la producción del antibiótico 11,837 R.P. pueden variar en una medida bastante amplia y adaptarse a cada una de las necesidades especiales.

25.

El antibiótico 11,837 R.P. puede aislarse de los mostos de fermentación por distintos métodos.

30.

El mosto de fermentación, puede filtrarse a un pH superior ó igual a 7, pero en estas con-



- diciones, una parte importante de la actividad queda en la torta de filtración que es preciso tratar también para extraer el producto activo. Es pues preferible llevar a cabo la filtración a un pH inferior a 5 y, con preferencia, próximo a 3; en estas condiciones, toda la actividad permanece en la torta de filtración de la que puede extraerse a un pH comprendido entre 3 y 7, mediante agua que contenga un alcohol de bajo peso molecular, tal como
5. el metanol, el etanol o el propanol, ó por una mezcla de alcoholes alifáticos inferiores, que contengan como máximo 6 átomos de carbono; la mezcla más adecuada contiene butanol normal + metanol en proporciones de 2:1 a 3:1 en volúmenes. Puede también hacerse pasar el mosto de fermentación en una
10. columna que contenga una resina de cambio de iones de carácter aniónico enérgico, y luego separar por un disolvente hidroalcohólico tal como el metanol acuoso que contenga un electrólito.
- 15.
20. El producto bruto puede aislarse partiendo de las soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas antes indicadas, por concentración de la solución bajo un pequeño volumen; esta concentración se realiza cómodamente a una temperatura inferior
25. a 40°, bajo presión reducida. Por enfriamiento y/o por adición de un mal disolvente del 11,837 R.P. tal como una cetona, un éter, un éster, un disolvente clorado, el benceno o el hexano, precipitan el antibiótico bruto. Cuando el antibiótico se encuentra en el filtrado de los mostos de cultivo, se
- 30.

304196



-21-

- somete esta solución a una extracción por un disolvente no-miscible con el agua, tal como un alcohol alifático, con 4 ó 5 átomos de carbono. Se procede a continuación como antes se ha indicado: concentración a bajo volúmen y precipitación.
- 5.
- El 11,837 R.P. puede purificarse entonces por fijación en una resina de cambio de iones de naturaleza aniónica enérgica, y luego mediante separación por una solución hidroalcohólica que
10. contenga un electrolito tal como el ácido clorhídrico o los cloruros de sodio, de amonio, de potasio, de calcio o de magnesio a razón de 5 a 50 g/l de separado. Este se concentra a continuación a pequeño volumen a una temperatura inferior a 40° bajo
15. presión reducida y el concentrado se somete a una dialisis contra una corriente de agua destilada, por medio de una membrana de celulosa regenerada. Las sales minerales y las distintas impurezas son arrastradas por el agua, y el 11,837 R.P. permanece integralmente en la solución dializada. Esta última se concentra azeotrópicamente por adición de butanol, a presión reducida, a un volúmen muy pequeño. El antibiótico purificado, se precipita del concentrado acuoso por una mezcla de disolvente tal como
20. acetona e isopropanol, eventualmente adicionada de éter o de óxido de isopropilo, en proporciones tales que no exista "demixión" durante la mezcla con la fase acuosa; las mezclas preferidas son acetona-isopropanol (4:1 en volumen) y acetona-isopropanol-
25. éter (1:1:1 en volúmenes).
- 30.

304196

-22-



5. Puede someterse el antibiótico a una segunda purificación que consiste en agitar una solución acuosa de 11,837 R.P. con una resina de cambio de iones, de naturaleza catiónica energética, hasta alcanzar un pH constante comprendido entre 2 y 3. El efluente se lava inmediatamente por un disolvente no miscible con agua, tal como un alcohol alifático de 4 ó 5 átomos de carbono, o un éster tal como el acetato de etilo, o una mezcla de dichos disolventes. Con preferencia se trabaja con ayuda de una mezcla, en volúmenes iguales, de butanol normal y de acetato de etilo. La fase acuosa se concentra al 1/100, se adiciona de butanol y se concentra, a presión reducida con adición continua de butanol. El 11,837 R.P. purificado se obtiene por adición de un mal disolvente del antibiótico, tal como el hexano, centrifugación, lavado y secado.

20. Se comprende que los distintos métodos indicados pueden aplicarse sucesivamente en un orden variado, o repetirse varias veces, según los imperativos de la fabricación, para obtener el 11,837 R.P. en una forma conveniente a las aplicaciones previstas.

25. Los ejemplos siguientes, dados a título no limitativo, muestran de que modo este invento puede aplicarse en la práctica. En lo siguiente, la actividad se determina siempre por dosificación biológica, por el método de difusión utilizado *Bacillus subtilis* como germen sencillo, y con
- 30.

304196

-23-

19



respecto a una muestra de 11.837 R.P. puro, tomada como patrón. Esta actividad se expresa en unidades (u) /mg para los productos sólidos, y en unidades por cm<sup>3</sup> para las soluciones (la unidad se define como la cantidad menor de producto que, disuelta en 1 cm<sup>3</sup> de un medio de cultivo adecuado, inhibe el crecimiento o desarrollo del *Staphylococcus aureus* 209 P en condiciones determinadas).

5.

define como la cantidad menor de producto que, disuelta en 1 cm<sup>3</sup> de un medio de cultivo adecuado, inhibe el crecimiento o desarrollo del *Staphylococcus aureus* 209 P en condiciones determinadas).

EJEMPLO 1 -

10.

En un fermentador de 170 litros, se

cargan:

"Corn steep" 4,800 kg.

Glucosa hidratada 2,400 "

Cloruro sódico 0,600 "

15.

Sulfato magnésico 0,120 "

Agua, la precisa para 100 l.

Después de ajustar el pH de la mezcla a 7,15 con 575 cm<sup>3</sup> de sosa concentrada, (d = 1,33) se añade, además,

20.

carbonato cálcico 0,600 kg.

El medio de cultivo se esteriliza a continuación por barboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Después de enfriar, el volumen del caldo es de 120 l y el pH, de 7,15. El medio se siembra con 200 cm<sup>3</sup> de un cultivo en erlenmeyer agitado de la cepa *Streptomyces viridans* DS 9466. El cultivo se desarrolla a 26°C durante 28 horas agitando y aireando con aire esteril; en estas condiciones es adecuado para la siembra del cultivo pro-

30.

ductor.

304196



-24-

El cultivo productor se realiza en fermentador de 350 litros cargado con las sustancias siguientes:

- |     |  |          |
|-----|--|----------|
|     | Harina de soja                                 | 8 kg.    |
| 5.  | "Distillers solubles"                          | 1 "      |
|     | Almidón  | 3 "      |
|     | Aceite de soja                                 | 3 litros |
|     | Carbonato de calcio                            | 2 kg.    |
|     | Cloruro de sodio                               | 2 kg.    |
| 10. | Cloruro de cobalto hidratado ( $6 H_2O$ ), 4 g |          |
|     | Agua, la precisa para 180 litros               |          |

El medio, de pH 7,05 se esteriliza por barboteo de vapor a  $122^{\circ}C$ , durante 40 minutos.

- Después de enfriar, el volumen del caldo es de 200 litros y el pH, de 7,15. Se siembra con 20 litros del cultivo "inoculum" en fermentador de 170 litros, antes descrito. El cultivo se realiza a  $26-27^{\circ}C$  durante 138 horas, agitando y aireando con aire estéril. El pH del medio es en estas condiciones, de 7,9 y el volumen del mosto, de 180 litros. La cantidad de antibiótico presente en el mosto de fermentación, es de 4515 u/cm<sup>3</sup>.

EJEMPLO 2 -

- El cultivo "inoculum" se realiza en fermentador de 170 litros, en las condiciones descritas en el Ejemplo 1.

El cultivo productor se realiza en fermentador de 350 litros cargado con las sustancias siguientes:

304196



-25-

5. "corn steep" 6 kg  
almidón 2 kg  
aceite de soja 3 litros  
cloruro de cobalto hidratado 4 g  
( $6H_2O$ )  
agua, la precisa para 175 litros

Después de ajustar el pH de la mezcla a 5,9 con 380 cm<sup>3</sup> de sosa concentrada (d = 1,33) se añade todavía:

10. carbonato de calcio 1 kg

La mezcla se esteriliza por barboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Después de enfriar se completa el medio de cultivo, por adición estéril de la solución siguiente:

15. sulfato de amonio 0,4 kg  
agua, la precisa para 5 litros

20. El volúmen del caldo, en estas condiciones, es de 200 litros y su pH, de 6,80. Se siembra con 20 litros del cultivo "inoculum" en fermentador de 170 litros. El cultivo se desarrolla a 26-27°C durante 144 horas agitando y aireando con aire estéril. El pH final del cultivo es de 8,4 y el volúmen del mosto de fermentación, de 185 litros. La cantidad de antibiótico presente en el mosto de fermentación es de 3550 u/cm<sup>3</sup>.
- 25.

EJEMPLO 3 -

30. Se ajustan 200 litros de mosto de fermentación con una titulación de 2855 u/cm<sup>3</sup> al pH de 8,4, al pH de 3, por adición de una solución de ácido clorhídrico 5 N en una cuba provista de agita-

304196



-26-

5. dor. Se añade luego 12 kg de auxiliar de filtración. La mezcla se filtra en filtro-prensa y la torta de filtración se lava con 60 litros de agua corriente. El filtrado y el lavado prácticamente inactivos, se desechan. La torta de filtración se suspende, con agitación, en 150 litros de una mezcla de butanol (2 volúmenes) y de metanol (1 volumen). El pH aparente de la mezcla se ajusta luego a 6 por adición de una solución de sosa 10 N. La agitación se conserva durante 30 minutos y luego la papilla se filtra en filtro-prensa.

10. Se recoge el filtrado, y la torta se lava con 30 litros de la mezcla de butanol y de metanol antes descrito. El conjunto del filtrado y del lavado (185 litros), titula 2075 u/cm<sup>3</sup>. La torta se desecha, El filtrado alcohólico se concentra a presión reducida (20 mm de mercurio) a 35° hasta un volumen de 2 litros.

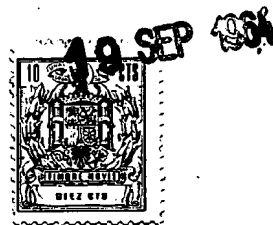
15. El antibiótico se precipita durante la concentración se aísla por filtración y se lava con acetona, y se seca en estufa en vacío (5 mm de mercurio); así se obtienen 254 g de un producto gris verde de una titulación de 1025 u/mg.

EJEMPLO 4 -

20. Con objeto de eliminar las partículas más bastas, se tamizan 375 litros de mosto de cultivo de pH 7,9. Este se ajusta a 7 con ácido clorhídrico 5 N en una cuba agitada y luego se añaden 22,5 litros de resina Dowex 1 X 2 en ciclo cloruro. La agitación se prolonga durante 2 horas.
25. 30.

304196

-27-



- Después de este tiempo, la mezcla se pasa por un tamiz vibratorio. La resina queda retenida sobre el tamiz y el mosto apurado se desecha. La resina se carga a continuación en una columna y se somete sucesivamente a un lavado con 50 litros de una solución acuosa al 5% de cloruro sódico, y luego con 10 litros de agua. La resina lavada se deshidrata a continuación por paso de 20 litros de metanol. La elución se realiza mediante una solución de metanol con 20% de agua y 2,8% de cloruro amónico. Los productos de la elución se fraccionan cada 10 litros. Las tres primeras fracciones de elución contienen 98% de la actividad eluida. Se reúnen y concentran a presión reducida (20 mm de mercurio) hasta un volumen de 3 litros. La solución concentrada, de título 92,950 u/cm<sup>3</sup> y densidad 1,057, se dializa durante 48 horas contra agua destilada, mediante una membrana de celofana. Después de este período el volumen de la solución es de 4,7 litros y la densidad, 1,025. La solución se concentra a presión reducida (5 mm de mercurio) a 300 cm<sup>3</sup> y luego se somete a una liofilización. Se obtienen así 48 g de producto bruto, con una titulación de 6530 u/mg.

25. EJEMPLO 5 -

Se disuelven en 4 litros de agua de pH 8, 250 g de antibiótico bruto preparado como se indica en el Ejemplo 3.

30. La solución acuosa se filtra, luego se hace pasar por una columna que contenga 2,7 li-

304196

-28-



5. tros de resina de cambio de iones Dowex 1 X 2 en ciclo cloruro; el efluente se retira. La resina se lava con 2,5 l. de agua y luego con 2,5 l. de mezcla metanol-agua (80:20 en volúmenes). El antibiótico se somete finalmente a elución, mediante 10 l. de mezcla metanol-agua (80:20 volumen/volumen) conteniendo 7,5 g/l de cloruro potásico.
10. El producto eluido se concentra a 400 cm<sup>3</sup> bajo presión reducida (20 mm de mercurio) a una temperatura inferior a 40°C; el concentrado se dializa durante 24 horas, contra una corriente de agua destilada, por la intermediación de una membrana de celulosa regenerada, con objeto de eliminar las sales minerales y distintas impurezas orgánicas.
15. La solución dializada que contiene la totalidad de la actividad del producto eluido (650 cm<sup>3</sup>) se concentra a presión reducida (20 mm de mercurio) hasta 125 cm<sup>3</sup>.
20. Al concentrado así obtenido se le añaden 20 volúmenes de una mezcla éter-acetona-isopropanol (10:10:10 en volúmenes) lo cual provoca la precipitación del antibiótico; después de la filtración, lavado con acetona y secado durante una noche a 35°, a 2 mm de mercurio, se recogen 8,25 g de un polvo castaño claro que titula 24600 u/mg.
25. EJEMPLO 6 -
30. Se disuelven 7,9 g del producto obtenido en el Ejemplo 5, en 790 cm<sup>3</sup> de la fase densa separada de la mezcla n.butanol-acetato de etilo-agua

30419



1964

-29-

- (10:10:20 en volúmenes), y se agita hasta un pH constante (2,1) con Amberlite I R 120 en ciclo ácido, agregada por pequeñas fracciones (50 cm<sup>3</sup> al total); la resina se filtra y la solución obtenida se lava dos veces con 790 cm<sup>3</sup> de la fase ligera separada de la mezcla anterior; los lavados, a su vez, se extraen de nuevo por un mismo volumen de fase densa.
- 5.

- Las fases densas se reúnen y se concentran a presión reducida (20 mm de mercurio) a 15 cm<sup>3</sup>; al concentrado acuoso obtenido se le agregan 20 volúmenes de mezcla metanol-éter (4:6 en volúmenes). El antibiótico precipita y se recogen 3,05 g de un primer chorro con una titulación de 18,300 u/mg.
- 10.
- 15.

- El filtrado se concentra a presión reducida (20 mm de mercurio) hasta un volumen de 100 cm<sup>3</sup>. Se añaden en estas condiciones 320 cm<sup>3</sup> de metanol y 35 cm<sup>3</sup> de butanol normal. Se concentra a 15 cm<sup>3</sup> bajo presión reducida (20 mm de mercurio) a temperatura inferior a 40°C. Después de añadir 15 volúmenes de hexano normal, centrifugar, lavar con hexano y secar durante una noche a 35°C, a 2 mm de mercurio, se obtiene 1,78 g del antibiótico purificado, con una titulación de 36,000 u/mg.
- 20.
- 25.

- Además, las fases ligeras reunidas se concentran a presión reducida (20 mm de mercurio) a unos 70 cm<sup>3</sup>; por adición de 15 volúmenes de hexano, se aíslan 1,5 g de polvo marrón con una titulación de 17,200 u/mg.
- 30.

304196

-30-



EJEMPLO 7 -

5. Se disuelven en 20 cm<sup>3</sup> de agua, 542 mg del antibiótico preparado en el Ejemplo 6 con una titulación de 36,000 u/mg; el pH que es de 2,3 después de esta disolución se ajusta a 6,85 por 8,9 cm<sup>3</sup> de sosa 0,1 N y la solución neutra se liofiliza. Se obtienen así 565 mg de sal sódica del antibiótico, cuya disolución acuosa presenta un máximo de absorción en el ultravioleta a 256,5 m $\mu$  ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 106$ ). Su composición elemental es:

10. C% = 47,4; H% = 7,07; O% = 35,3; (por diferencia)  
N% = 5,01; P% = 1,84; Na% = 3,4.

EJEMPLO 8 -

15. En 500 cm<sup>3</sup> de agua destilada se disuelven 50 g de antibiótico preparado como en el Ejemplo 5; la solución se dializa una noche contra 40 litros de agua destilada por intermediación de una membrana de celulosa regenerada.

20. Después de la dialisis, a la solución del antibiótico se le agrega un volumen de n.propanol, y la mezcla se introduce en la parte superior de una columna cargada con, de la parte inferior a la superior: negro granulado "Acticarbón BS 40-80", previamente lavado con ácido clorhídrico diluido, 75 g; Amberlite IR 120 (ciclo H), 125 cm<sup>3</sup>; negro granulado de la misma calidad anterior, 500 g.

25.

30. Después de terminar el paso de la solución de antibiótico, se continua elucionando por la mezcla n.propanol-agua (50:50 en volúmenes); las fracciones activas (7 litros) se agrupan, se

304196



-31-

neutralizan al pH 7 por sosa normal, y se concentran a presión reducida a temperatura inferior a 40°C, hasta 140 cm<sup>3</sup>.

5. El concentrado se dializa 24 horas contra 4 veces 10 litros de agua destilada, y luego se le agrega un volumen de n-propanol.

10. El antibiótico se precipita a continuación por adición de 10 volúmenes de acetona. Después de aislar y secar, se recogen 23,5 g de antibiótico en forma de sal sódica con una titulación de 42,400 u/mg.

EJEMPLO 9 -

15. En 110 cm<sup>3</sup> de agua, se disuelven 22 g del antibiótico preparado en el Ejemplo 8; a la solución se le agregan 110 cm<sup>3</sup> de n-propanol, y la mezcla se hace pasar por una columna que contenga 100 cm<sup>3</sup> de alúmina previamente lavada, a pH 4. El desarrollo y la elución se prosiguen con la mezcla n-propanol-agua (50:50 en volumen).

20. Las fracciones activas se agrupan (430 cm<sup>3</sup>), se concentran a presión reducida, a temperatura inferior a 40°C, hasta 100 cm<sup>3</sup>; el concentrado se dializa una noche contra 10 litros de agua destilada. Al dializado se le añade un volumen de n-propanol y el principio activo se precipita por 10 volúmenes de acetona. Así se recogen 12 g de antibiótico purificado en forma de sal sódica con una titulación de 44,000 u/mg y con las características siguientes:
- 25.

304196



-32-

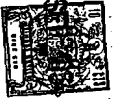
C% = 45; H% = 7,4; O% = 37,6 (por diferencia)

N% = 3,72; P% = 2,16; Na% = 4,15

$\alpha_D^{22} = + 6^{\circ} \pm 1$  (C = 0,6% - agua)

Espectro ultravioleta: fin de absorción:  $m^{\mu}$   $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$

220	30
257	3,5



## T A B L A VI

Medios de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo o enves del cultivo	Conjunto aéreo (comprendiendo combinación de micelio aéreo de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades biológicas
Gelosa de Bennett (Ref. A)	Bueno	Enves amarillito grisáceo que se filia en marrón-verde en los puntos en que se produce pigmento verde soluble.	Grisáceo claro gris oscuro. Bien desarrollado.	Verde, que por envejecimiento se transforma en gris verdoso, a verde pardo muy oscuro, que vá hasta el negro, según la cantidad producida.	La producción de pigmento verde soluble se favorece por la presencia de tierra.
Gelosa maltosa-tripona (Ref. B)	Bueno	Enves marrón amarillito grisáceo.	Blancuzco a gris	Gris marrón poco intenso.	
Gelosa de Emerson (W-23)	Mediano	Marrón amarillito claro. Bien desarrollado.	Blancuzco, en estado de trazas.	Nulo	
Gelosa-Glucosa-peptona. (W-7)	Mediano	Amarillito claro, bastante bien desarrollado.	Blancuzco, muy derivado.	Amarillento poco intenso	
Gelosa nutritiva (W-5)	Pobre	Amarillito grisáceo claro. Desarrollo moderado.	Nulo.	Nulo	
Gelosa Glucosa-esparaginina (W-2)	Mediano	Amarillito vivo a amarillito pardo.	Nulo al final de dos semanas. En cultivos viejos, desarrollo moderado blancuzco a gris.	Nulo durante dos semanas. Al cabo de un mes grisáceo a gris verdoso en pequeña cantidad.	
Gelosa glicerina-esparaginina (W-3)	Moderado	Amarillito parduzco con, irregularmente, trazas de verdoso.	Blanco grisáceo grisáceo claro. Desarrollo muy moderado.	Gris parduzco poco intenso. Además, irregularmente, pequeñas cantidades de verdoso a gris verde.	Solubilización del malato de calcio.
Gelosa al malato de calcio de Krainsky (Ref. C)	Bueno	Enves amarillito grisáceo claro.	Blancuzco a gris claro.	Nulo o tenuemente grisáceo poco intenso.	
Gelosa a la tirgina. (Ref. D)	Bueno	Enves castaño amarillito.	Blancuzco moderadamente desarrollado.	Castaño amarillito	Buena solubilización de la tirgina.
Gelosa al almidón (W-11)	Moderado	Enves gris verdoso a pardo verde oscuro.	Blancuzco a gris moderadamente desarrollado.	Verde grisáceo a gris ver-	





304196



Medios de cultivo desarrollados.	Grado de desarrollo.	Micelio vegetativo o envas del cultivo.	Conjunto séreo (comprendiendo la combinación del micelio séreo y de la división de colonias).	Observaciones y propiedades bioquímicas
Gelosa al almidón de Pridham (Ref. E)	Bueno	Envas amarillo grisáceo claro.	Gris claro bastante bien desarrollado.	Hidrólisis media del almidón.
Gelosa sintética de Czapek a la glicerina (Ref. F)	Bueno	Envas amarillo marrón claro a marrón amarillito. Se tñe más de marrón verde oscuro al nivel en donde se produce pigmento verde soluble.	Blancuzco a gris claro. Desarrollado moderado.	La presencia de tierra influye considerablemente en la producción de pigmento verde soluble en este medio.
Cultivo en patata (Ref. 27)	Bastante bueno	Micelio vegetativo marrón amarillito verdoso a verde muy oscuro, que se transforma en marrón negrozco por envejecimiento.	Blancuzco a grisáceo. Desarrollado moderado.	Producido más o menos tardíamente. Abundante. Verde muy oscuro que se transforma en negro verdusco difundido en toda la patata.
Gelatina pura a 12% (Ref. 6)	Mediano	Cultivo en superficie limitada al nivel del punto de inoculación. Envas amarillito.	Blancuzco a grisáceo. Desarrollado moderado.	Liquefacción de la gelatina positiva pero relativamente lenta, incompleta en un mes.
Caldo nutritivo no tratado (Ref. H)	Bueno	Anillo blancuzco en superficie.	Desarrollado muy reducido. Blancuzco.	Reacción de los nitritos fuertemente positiva.
Caldo glucosa-nitratado de Dimnick (Ref. I)	Moderado	Ligero anillo y velo muy moderadamente desarrollados superficialmente. Blanco grisáceo a amarillento claro.	Nulo o blancuzco en estado de trazas.	Reacción de los nitritos fuertemente positiva.
Caldo sintético de Czapek a la celulosa (Ref. J)	Bastante bueno	Anillo bien desarrollado. Amarillento muy pálido.	Gris. Bien desarrollado en toda la parte del papel que sobresale del caldo.	Reacción de los nitritos fuertemente positiva.
Leche desnatada a 26% (Ref. K)	Bueno	Anillo medianamente desarrollado. Amarillito claro a pardo amarillito claro.	Nulo a ligeras trazas blancuzcas.	Aspecto inalterado de la leche durante dos semanas. Luego peptonización lenta, casi total al cabo de un mes de cultivo. Sin coagulación. El pH pasa de 6,3 a 7,2-7,4 en un mes.
Medio de Dresner y Danze (Ref. L)	Bastante	Anillo medianamente desarrollado. Amarillito claro a pardo amarillito claro.	Nulo a ligeras trazas blancuzcas.	Aspecto inalterado de la leche durante dos semanas. Al cabo de 3 a 4 semanas de cultivo, ligera coagulación con principio de pep...



N O T A

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente presentada en Francia nº PV. 948.030 de fecha 19 de septiembre de 1.963 acogiéndose, por lo tanto, a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE ANTIBIOTICOS"; caracterizándose por lo siguiente:
- 1º - Procedimiento de preparación del antibiótico 11,837 R.P. de las características siguientes; es un polvo amorfo blanco, que se descompone a partir de 160º; es muy soluble en el agua, soluble en el metanol, la piridina, el ácido acético, la dimetilformamida; poco o nada soluble en el etanol, la acetona, el cloroformo, el hexano normal; contiene carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y su composición elemental es próxima de C% = 46,9; H% = 7,9; O% = 39,2; N% = 3,9; P% = 2,25; su sal sódica es un polvo amorfo prácticamente blanco, de composición elemental; C% = 45; H% = 7,4; O% = 37,6; N% = 3,72; P% = 2,16; Na% = 4,15 y de poder rotatorio:  $(\alpha)_D^{22} = + 6^\circ \pm 1$  (c = 0,6-agua); caracterizado
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

3.4196



-36-

19 SEP 1952

5. por cultivar la nueva cepa *Streptomyces viridans* DS 9466 (N R R L 3087) en un medio clásico conveniente y en las condiciones aerobias habituales para este género de cultivo por separarse luego el antibiótico formado, por aplicación de los métodos de extracción y de purificación clásicos.

2ª - Procedimiento de preparación de antibióticos, tal y como queda substancialmente descrito en la presente Memoria.

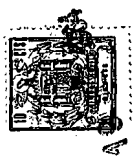
10. Esta Memoria consta de treinta y seis hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 19 SEP 1952

RHONE-POULENC, S.A.

F. GOMEZ ACEBO Y MOGGI

304196



304196



19

FIG. 1

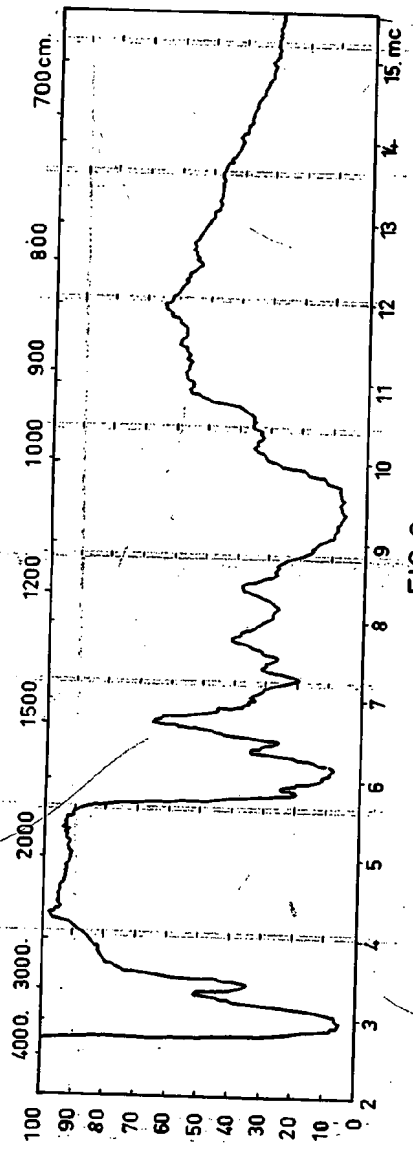
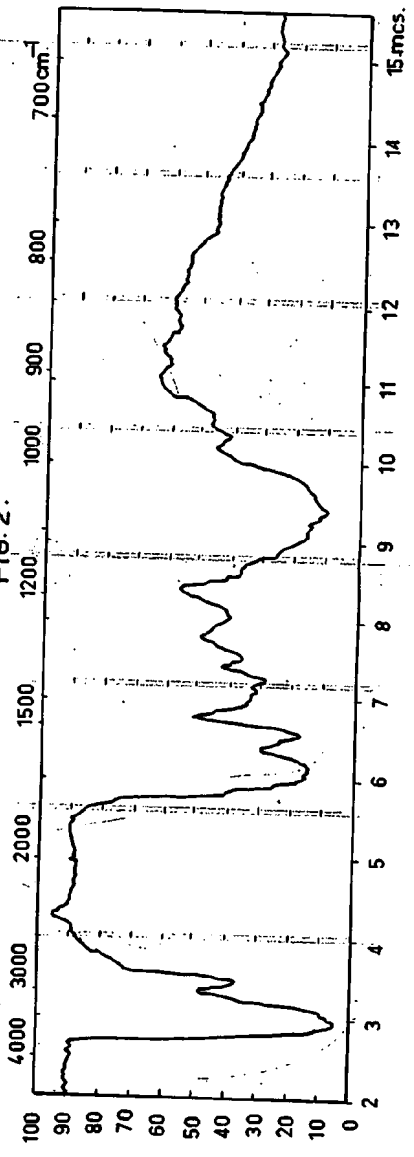
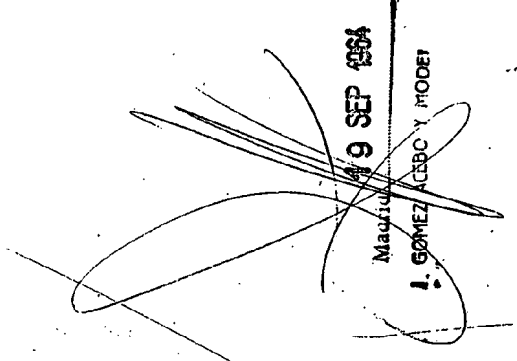


FIG. 2



  
 Madrid  
 19 SEP 1964  
 J. GOMEZ ACEBO Y MOBER