



304651

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de registro de una Patente de Invención, por veinte años, en España, por "Procedimiento de fermentación de nuevos antibióticos", a favor de la entidad "COMPANIA ESPANOLA DE LA PENICILINA Y ANTIBIOTICOS, S.A." (CEPA, de nacionalidad española, con domicilio en Madrid, calle de Méndez Alvaro, nº 57.

- - -

Esta invención se refiere a nuevos agentes antibióticos y al procedimiento para su preparación. Mas particularmente, se relaciona con una nueva sustancia antibiótica conocida como Antibiótico 235A (o, alternativamente, como Antibiótico MSD 235) y con el procedimiento para la producción de dicha nueva sustancia.

El descubrimiento de las notables propiedades terapéuticas de la penicilina avivó el interés en este campo, interés cuyo resultado fué el descubrimiento de otros muchos antibióticos valiosos tales como la tetraciclina, estreptomina, la bacitracina, el cloramfenicol, la eritromicina, la novobiocina y otros más. Generalmente, tales antibióticos son particularmente activos contra ciertas bacterias Gram-positivas. Otros son activos contra bacterias Gram-negativas. Sin embargo, la actividad de estos antibióticos individuales normalmente está limitada a unas cuantas especies o razas de microorganismos patógenos, continuándose, por consiguiente, los trabajos en ese campo, en un esfuerzo por encontrar otros antibióticos que fuesen eficaces contra otros microorganismos patógenos.

304651



Aunque algunos de estos antibióticos hayan demostrado su eficacia en el tratamiento de diversas enfermedades, se ha averiguado que ciertas especies o razas de microorganismos patógenos se resisten a un determinado antibiótico y que, por consiguiente, el antibiótico no resulta muy activo contra estas especies o razas.

Por ello, las deficiencias de los antibióticos conocidos han estimulado las investigaciones para hallar otros antibióticos que fueran activos contra un mayor número de gérmenes y, en particular, para hallar antibióticos que fueran activos contra razas resistentes de gérmenes patógenos.

Uno de los objetos de la presente invención lo constituye un nuevo y útil antibiótico, altamente eficaz en la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas, particularmente las bacterias Gram-negativas.

Otro de sus objetos es el procedimiento de preparación de esta nueva sustancia antibiótica por fermentación de medios nutritivos con razas adecuadas de especies de microorganismos seleccionados del género Streptomyces.

Otros objetos se pondrán de manifiesto a través de la detallada descripción que a continuación se efectúa.

La nueva sustancia antibiótica de la presente invención se obtiene por cultivo, bajo condiciones controladas, de razas de microorganismos seleccionadas de ciertas especies de Streptomyces. Dos de tales especies han sido designadas como Streptomyces lavendulae y Streptomyces avidinii. Estos dos cultivos han sido depositados en el "Northern Utilization Research Branch" de U.S.D.A. bajo los números NRRL 3076 y 3077, respectivamente (Nuestros números MA669 y 833, respectivamente).

Las características morfológicas y de cultivo de las razas de Streptomyces productoras del Antibiótico 235A son ex

304651



puestas en el siguiente cuadro.

DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS
DE CULTIVO DE LOS ORGANISMOS QUE
PRODUCEN EL ANTIBIOTICO 235A.

(Incubación: 20 días a 28° C.)

Placas de agar, pasta de tomate-avena.

Los cultivos MA-669, MA-788, MA-831 y MA-872 muestran penachos abundantes, planos, aterciopelados y blancos; micelio aéreo rojo (5dc); y reverso pardo.

10 El cultivo MA-751 exhibe penachos abundantes, ligeramente elevados, aterciopelados y blancos; micelio aéreo rojo (5dc) y reverso de marrón a negro.

Los cultivos MA-771 y MA-861 exhiben penachos abundantes, planos, aterciopelados y negros; micelio aéreo rojo (5dc); y reverso de marrón a negro.

Los cultivos MA-819, MA-842 y MA-962 muestran penachos abundantes, ligeramente elevados, aterciopelados y blancos; micelio aéreo rojo (5dc); reverso marrón.

20 El cultivo MA-833 exhibe penachos abundantes, planos, aterciopelados y blancos, micelio aéreo gris (5fe); y reverso marrón.

El cultivo MA-936 exhibe penachos abundantes, ligeramente elevados, aterciopelados y blancos; micelio aéreo rojo (5cd), y reverso marrón oscuro.

25 Placas de Agar Czapek.

Los cultivos MA-669, MA-751, MA-771, MA-788, MA-819, MA-831, MA-833, MA-842, MA-861, MA-872, MA-926 y MA-936 exhiben un crecimiento ligero que se difunde y va del incoloro al color crema; micelio aéreo blanco (a) → rojo (5cb), ningún pigmento soluble y reverso blanco.

30 El Streptomyces lavendulae exhibe un crecimiento ligero que se difunde y va del incoloro al color crema; micelio

304651



aéreo blanco algodonoso →lavendar vinoso; y ningún pigmento soluble.

Placas de Agar Glicerol-Esparreguina.

Los cultivos MA-669, MA-751, MA-771, MA-788, MA-819,
5 MA-831, MA-833, MA-842, MA-861, MA-872, MA-926 y MA-936 no exhiben pigmento soluble alguno.

Placas de Agar sintético (Agar glucosa-esparreguina).

El cultivo MA-669 muestra un crecimiento bueno, plano y aterciopelado; micelio aéreo rojo (5dc); ningún pigmento
10 soluble y reverso amarillo (1dc).

El cultivo MA-751 exhibe un crecimiento abundante, plano y aterciopelado; micelio aéreo rojo (5dc); ningún pigmento soluble y reverso amarillo (2db).

El cultivo MA-771 exhibe un crecimiento abundante,
15 plano y aterciopelado; micelio aéreo rojo (5dc); ningún pigmento soluble y reverso amarillo (2fb).

El cultivo MA-788 exhibe un crecimiento limpio, plano y aterciopelado; micelio aéreo blanco (a); ningún pigmento soluble y reverso blanco (a).

El cultivo MA-819 exhibe un crecimiento bueno, elevado y aterciopelado; micelio aéreo rojo (5gc); ningún pigmento soluble y reverso amarillo (2db).

El cultivo MA-831 exhibe un crecimiento bueno, plano y aterciopelado; micelio aéreo rojo (6ec); ningún pigmento soluble y reverso amarillo (2db).

El cultivo MA-833 exhibe penachos abundantes, planos aterciopelados y blancos; micelio aéreo gris (5fc); ningún pigmento soluble y reverso gris (2ih).

El cultivo 842 exhibe un crecimiento bueno, plano y aterciopelado; micelio aéreo blanco (a); ningún pigmento soluble y reverso amarillo (2fb).

El cultivo 861 exhibe un crecimiento bueno, plano y aterciopelado; micelio aéreo rojo (5cb-5dc); ningún pigmento



soluble, y reverso amarillo (2db-2fb).

El cultivo MA-872 exhibe penachos abundantes, planos, aterciopelados y blancos; micelio aéreo rojo (5dc); ningún pigmento soluble y reverso amarillo (2fb).

5 El cultivo MA-926 exhibe un crecimiento bueno, plano y aterciopelado; micelio aéreo blanco (a); ningún pigmento soluble y reverso amarillo (2fb).

10 El cultivo MA-936 exhibe un crecimiento abundante, plano y aterciopelado; micelio aéreo rojo (4gc); ningún pigmento soluble y reverso pardo dorado.

El Streptomyces lavendulae exhibe un crecimiento amarillento; micelio aéreo blanco de color lavéndula.

Cuña de patata.

15 El cultivo MA-669 exhibe un crecimiento limpio, micelio aéreo gris (d) y pigmento soluble negro tirando a marrón.

El cultivo MA-751 exhibe un crecimiento abundante, micelio aéreo gris (d) --> rojo (5dc) y pigmento soluble negro tirando a marrón.

20 El cultivo MA-771 exhibe un crecimiento abundante, de color crema; micelio aéreo gris -> rojo (5dc) y pigmento soluble marrón.

El cultivo MA-788 exhibe un crecimiento regular marrón; micelio aéreo rojo (5dc) y pigmento soluble negro tirando a marrón.

25 Los cultivos MA-819 y MA-831 exhiben un crecimiento regular marrón; micelio aéreo gris (c) y pigmento soluble negro tirando a marrón.

30 El cultivo MA-833 exhibe un crecimiento abundante y marrón; micelio aéreo gris (2dc) y pigmento soluble negro tirando a marrón.

El cultivo MA-842 exhibe un crecimiento bueno y marrón, micelio aéreo gris y pigmento soluble negro tirando a marrón.

304651



El cultivo MA-861 exhibe un crecimiento abundante y marrón; micelio aéreo gris (2 dc-g) y pigmento soluble negro tirando a marrón.

5 El cultivo MA-872 exhibe un crecimiento abundante, de color crema; micelio aéreo gris (d) y pigmento soluble marrón.

El cultivo MA-926 exhibe un crecimiento bueno, de color crema; micelio aéreo gris (2dc) y pigmento soluble marrón.

10 El cultivo MA-936 exhibe un crecimiento abundante; micelio aéreo rojo (5ca-7ca) y pigmento soluble rojo.

El Streptomyces lavendulae exhibe un crecimiento ligero, arrugado, de color crema tirando a amarillento; ningún micelio aéreo y pigmento soluble negro.

Tubo de gelatina (Licuefacción).

15 Los cultivos MA-669, MA-861 y MA-936 exhiben un crecimiento de color crema; ningún micelio aéreo; pigmento soluble marrón y lenta licuación del medio gelatinoso.

20 Los cultivos MA-751, MA-771 y MA-819 exhiben un crecimiento de color crema a marrón oscuro; ningún micelio aéreo; pigmento soluble marrón y lenta licuación del medio gelatinoso.

25 Los cultivos MA-788, MA-831, MA-833, MA-842, MA-872 y MA-926 exhiben un crecimiento color crema; micelio aéreo gris; pigmento soluble marrón y lenta licuación del medio gelatinoso.

El Streptomyces lavendulae exhibe un crecimiento de superficie color crema tirando a marrón; ningún micelio aéreo o micelio aéreo blanco; pigmento soluble marrón y lenta licuación del medio gelatinoso.

30 Cada uno de los microorganismos, incluido el Streptomyces lavendulae, produce sulfuro de hidrógeno.

Cuando el cultivo se efectúa en placas agar de almi



304071

dón, éste es hidrolizado por el Streptomyces lavendulae y cada uno de los doce cultivos.

En agar nitrito, los siguientes cultivos reducen los nitratos a nitritos: MA-751, MA-771, MA-831, MA-842. Los restantes cultivos, MA-669, MA-788, MA-819, MA-833, MA-861, MA-872, MA-926, MA-936 y el Streptomyces lavendulae no producen ninguna reducción apreciable de los nitratos a nitritos.

UTILIZACION DE CARBONO

		Glucosa.	Xilosa.	Arabinosa.	Rhamnosa.	Refinosa.	Manosa.	Lactosa.
10	MA-669	+	-	-	-	-	+	-
	MA-751	+	+	+	-	-	-	-
15	MA-771	+	+	+	-	-	-	-
	MA-788	+	-	+	-	-	-	-
	MA-819	+	-	+	-	+	-	+
	MA-831	+	-	-	-	-	-	-
	MA-833	+	-	-	-	-	-	-
20	MA-833	+	-	-	-	-	-	-
	MA-842	+	-	-	-	-	-	-
	MA-861	+	+	+	-	-	-	-
	MA-872	+	+	+	-	-	-	-
	MA-926	+	-	-	-	-	-	+
25	MA-936	+	-	-	-	-	-	-
	<u>Streptomyces Lavendulae</u>	+	Varia ble	Varia ble	-	-	+	-

La anterior descripción de los microorganismos productores del Antibiótico 235A es suficiente para clasificar a las once razas, MA-669, MA-751, MA-771, MA-788, MA-819, MA-831, MA-842, MA-861, MA-872, MA-926 y MA-936 como miembros de la especie Streptomyces lavendulae y para clasificar al cultivo MA-833 como una nueva especie de Streptomyces a la que se asigna el nombre de Streptomyces avidinii en con-



374071

sideración a la excepcional naturaleza del cultivo y al descubrimiento de que produce una substancia que fija la biotina, la Streptoavidina. Ha de entenderse que la presente invención no se limita a los organismos que respondan a esta particular descripción. La presente invención se refiere también al caso de otras clases de Streptomyces lavendulae y Streptomyces avidinii que sean mutantes de los organismos descritos, tales como las mutantes obtenidas por selección natural, las producidas por agentes mutágenos, por ejemplo, irradiación de Rayos X, irradiación ultravioleta, mostazas nitrogenadas, y sus similares.

Los microorganismos anteriormente descritos han sido obtenidos de tierras de localidades dispersas por todo el mundo. El cultivo MA-833 fué aislado de una tierra encontrada en España. Los otros cultivos descritos fueron aislados de tierras encontradas en Nebraska, Massachusetts, Virginia Oeste, Ohio y Utah, en los Estados Unidos, así como en Europa y América del Sur.

Un examen superficial de los doce cultivos, desarrollados en medios complejos, indica la gran variación existente entre ellos. Las diferentes tierras, por consiguiente, producen distintas clases de cultivos, todos ellos pertenecientes al género Streptomyces.

Las claves empleadas para la reducción de estas cepas a su clasificación como especies son las descritas en el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7ª edición; y en el artículo aparecido en "Applied Microbiology 5", 52-79 (1958) "A guide for the Classification of Streptomycetes According to Selected Groups", por Fridhan Hesseltine y Benedict.

Se efectuaron detalladas comparaciones entre los cultivos productores del antibiótico 235-A y las características publicadas en el Manual de Bergey o en "The Actinomycetes",



304651

vol.2. Genera and Species, S.A. Waksman (1961) para los cultivos referidos, como seleccionados de las claves.

Los doce cultivos, MA-669, MA-751, MA-771, MA-788, MA-819, MA-831, MA-833, MA-842, MA-861, MA-872, MA-926 y MA-936, producen todos abundante pigmento soluble oscuro cuando se desarrollan en medios orgánicos tales como pasta de tomate, agar o patata, y, además, producen sulfuro de hidrógeno. Todos los cultivos, con excepción del MA-833, producen esporas de color lavéndula en medios de cultivo complejos. Cuando fueron examinados por la clave del Streptomyces publicada en "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7ª edición, los cultivos cumplían los requisitos correspondientes al Streptomyces lavendulae. Además, al compararlos con la descripción detallada del Streptomyces lavendulae tales diferencias aunque existentes son de carácter secundario y, por esta razón, los once aislamientos son considerados como miembros de la especie Streptomyces lavendulae.

Todos los cultivos producen esporóforas terminadas en cadenas de esporas que, al principiar el desarrollo del cultivo, son ondulares y que, a través de una ulterior incubación, progresan hacia un estado de enrollamiento para terminar en un enrollamiento apretado que, a menudo, les da la apariencia de una pelota. Por tanto, todos los cultivos, siguiendo la clasificación de Pridham, Hesseltine y Benedict, entran en la Sección "Spira". De acuerdo con Pridham, Hesseltine y Benedict, una clasificación secundaria, la "Series", se basa en el color del micelio esporulado. Todos los cultivos, con excepción del MA-833, son miembros de la Serie Roja; por el contrario, el MA-833 se diferencia claramente de los otros y está agrupado en la Serie Gris.

En los trabajos de Pridham, Hesseltine y Benedict, hay cuatro especies válidas formadoras de pigmentos agrupadas en la Sección Spira-Series Rojas que son descritas con deta-

304651



lle en "The Actinomycetes", vol. 2. de S.A.Waksman. Los produc-
tores del Antibiótico 235A anteriormente indicados (con excep-
ción del MA-833) pueden ser diferenciados de dos de estas espe-
cies previamente descritas sobre las bases siguientes: el Streptomyces purpurascens produce micelio aéreo en agar Czapek; pro-
5 duce un desarrollo color naranja en patata, hidroliza escasamen-
te el almidón y no produce H₂S; el Streptomyces roseocitreus
produce un desarrollo color rosa-violeta en agar, nitrato, pro-
duce un pigmento soluble amarillo en agar-esparraguina, carece
10 de pigmento soluble en gelatina o patata y muestra una hidrólisis débil del almidón.

Los once cultivos en consideración no se diferencian de un modo significativo de las especies Streptomyces lavendulae o Streptomyces griseoviridis, según se describen en "The Actinomycetes", vol.2. A causa de que la descripción original del Streptomyces lavendulae se presentó en 1.916, mientras que la descripción del Streptomyces griseoviridis no fué publicada hasta 1956, se considera que los once cultivos que producen el Antibiótico 235A deberían caracterizarse como Streptomyces lavendulae. Esta conclusión, basada en la clasificación de Pradhan, Hesseltine y Benedict y en la descripción contenida en "The Actinomycetes," vol.2, concuerda con la alcanzada por la clave contenida en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7ª edición.

Los once aislamientos productores de Antibiótico 235A son distintas clases de la especie Streptomyces lavendulae. Los caracteres definitorios de la clase son presentados en el Cuadro 1, y consisten en diferencias en tonalidades de color del micelio aéreo, diferencias en la consistencia del crecimiento, diferencias en color y extensión del producto en medios químicamente definidos, diferencias de color del producto en patata, y diferencias en capacidad para reducir nitrato.



El organismo final que queda para su identificación es el Streptomyces MA-833. El cultivo MA-833 se distingue por la formación de cadenas de esporas en espiral, por la producción de un pigmento soluble marrón y por la producción de sulfuro de hidrógeno.

En un medio complejo, por ejemplo, agar de pasta de tomate, el cultivo crece lentamente pero se diferencia vivamente de los otros productores del Antibiótico 235A produciendo esporas de un color definitivamente gris, sin matices de rojo o lavándula. Las esporas de color gris son producidas también en medios químicamente definidos.

Se efectuó una tentativa para caracterizar el cultivo por medio de la clave de Especies del género Streptomyces publicada en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7ª edición, tomando en consideración la formación de esporas de color gris en medio complejo. No se halló ninguna especie conocida a la que se pudiera asignar MA-833.

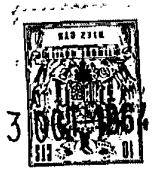
Ulteriores consideraciones fueron dedicadas a las nueve especies formadoras de pigmentos solubles de la Sección Spira-Serie Gris, reseñadas en la publicación de Pridham, Heggelstine y Benedict, que son descritas con detalle en "The Actinomycetes", vol.2. Fué posible diferenciar el MA-833 de los nueve cultivos sobre la base de las siguientes características: el Streptomyces aureus se caracteriza por la carencia de micelio aéreo en agar orgánico y por el crecimiento color naranja claro en agar de dextrosa esparraguina; el Streptomyces collinus no produce pigmento soluble en patata y produce un pigmento soluble rojo carmesí en agar de dextrosa-esparraguina; el Streptomyces cianeus produce un crecimiento de color azul, en una variedad de medios y muestra una débil hidrólisis de almidón; el Streptomyces filipiensis produce un pigmento soluble de color amarillo tanto en agar Czapek como en agar glicerol-esparraguina; el Streptomyces fimbriatus muestra un abundante



desarrollo en agar Czapek, un pigmento soluble rojizo en gelatina y es patógeno para las plantas; el Streptomyces griseochromogenes carece de cadenas de esporas en espiral y produce un crecimiento de color naranja en agar Czapek; el Streptomyces griseocruber, produce un desarrollo naranja rojizo en agar Czapek, un crecimiento naranja rojizo y un pigmento soluble amarillo en agar de almidón; el Streptomyces hawaiiensis muestra solamente una ligera licuefacción de gelatina y una ligera hidrólisis de almidón; y el Streptomyces direchromogenes se caracteriza por un pigmento soluble en agar de dextrosa esparra-
guina y una lenta licuefacción de gelatina.

No se conoce ninguna especie de microorganismo cuyos caracteres principales concuerden adecuadamente con MA-833. En vista de la característica coloración de la espora en agar de pasta de tomate, que claramente le diferencia de otros streptomycetes productores del 235A, se ha decidido reconocer a ésta nuevo tipo distintivo, adjudicándole la designación de una nueva especie. Se le asignó el nombre de Streptomyces avidinii en reconocimiento a la naturaleza desconocida del cultivo y a haberse reconocido por vez primera que un microorganismo puede producir una sustancia fijadora de la biotina, esto es, la Estreptoavidina.

El nuevo antibiótico 235A de la presente invención comprende, por lo menos, dos sustancias, de las cuales, una, designada como sustancia 235S, es una sustancia de peso molecular relativamente pequeño. La otra sustancia es designada como 235L y tiene un peso molecular relativamente grande. El nuevo antibiótico 235A se comporta en forma insólita en su actividad en el sentido de que sus componentes individuales no tienen actividad antibiótica contra los microorganismos patógenos de que se trata, excepto cuando se han ensayado en medios especialmente preparados, pero son activos contra microorganismos



30401

mos patógenos cuando las mezclas de los dos componentes se prueban contra microorganismos patógenos. Así, el nuevo antibiótico 235A está formado por un par sinérgico de sustancias designadas como 235S y 235L, o Estreptoavidina.

5 El Antibiótico 235S actúa como un material de peso molecular relativamente bajo, que puede ser separado en, por lo menos, tres componentes, designados como 235S₁, 235S₂ y 235S₃, por métodos de papel cromatográfico.

10 Así, usando los siguientes sistemas disolventes para el desarrollo de los cromatogramas, los Rf de los tres componentes individuales son determinados mediante el empleo de un preparado de Antibiótico 235S aislado del caldo de fermentación por un procedimiento de cambio de iones. El sistema disolvente I es alcohol n-butílico saturado con solución buffer (pH 9,3) de fosfato de hidrógeno disódico 0.25M acuoso.
15 El sistema disolvente II es alcohol n-butílico saturado con una solución de hidróxido de amonio 0.1N. En cada caso el papel es primeramente saturado con el buffer acuoso o la solución de amoniaco acuoso antes de aplicar la muestra al papel.
20 El tiempo de desarrollo es de 6 a 17 horas. Los resultados son los siguientes:

	<u>Sistema I</u>	<u>Sistema II</u> <u>6 horas.</u>
235S ₁	Rf = 0.14	Rf = 0.15
235S ₂	Rf = 0.28	Rf = 0.33
25 235S ₃	Rf = 0.47	Rf = 0.51

Cada uno de los componentes de bajo peso molecular del Antibiótico 235S se caracteriza por la propiedad de inhibir la síntesis intracelular de biotina de los microorganismos Gram-negativos.

30 El Antibiótico 235S₃ se ha obtenido en forma cristalina mediante los métodos que más adelante se describirán. El Antibiótico 235S₃ produce reacciones características de a-

304051

3



minas primarias y es soluble en agua, alcanoles inferiores, tales como metanol, etanol, isopropanol, n-butanol y en soluciones de acetona acuosa. El Antibiótico 235S₃ puede ser cristalizado de soluciones acuosas alcalinas por adición de acetona. El antibiótico 235S₃ cristalino, así preparado, tiene un punto de fusión de aproximadamente 217° C.

El Antibiótico 235S₃ es un compuesto ópticamente activo con una rotación de $[\alpha]_D^{25} = + 8.5^{\circ}$ (C.2 en ácido clorhídrico 0.1N) y $[\alpha]_D^{25} = + 9.5$ (C.2 en ácido clorhídrico 3.5N)

Las soluciones del antibiótico 235S₃ no tienen máximos apreciables en el campo de la absorción ultravioleta.

La absorción infrarroja de una muestra de Antibiótico 235S₃ cristalino, suspendido en aceite mineral (NUJCL), fué efectuada en un espectrofotómetro infrarrojo Baird Associates Modelo 12B, usando un prisma de cloruro de sodio, apareciendo una serie de picos característicos. Los más significativos de los cuales están en las siguientes longitudes de onda, expresadas en micrones: 3.04, 3.7-4.8 y 6-6.6. El espectro infrarrojo se reproduce en la Figura 1 de los adjuntos dibujos. Ha de hacerse notar que el espectro de absorción infrarroja es una medida de la absorción de Antibiótico 235S₃ en forma cristalina, preparada por adición lenta de acetona a una solución amoniacal acuosa de Antibiótico 235S₃. Aunque solamente se ha obtenido una forma cristalina, hay muchas substancias que se presentan con modificaciones polimórficas, en cuyo caso el espectro de absorción infrarroja puede tener diferencias pequeñas entre las diversas formas cristalinas.

El Antibiótico 235S₃ contiene los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. El siguiente es un análisis de la composición elemental obtenida en una muestra de 235S₃ cristalino:

304651



Carbono-----	63.1
Hidrógeno -----	8.9
Nitrógeno -----	13.04
Oxígeno (por diferencia) -----	14.96

5 . El Antibiótico 235S₃ es una amina primaria que forma sales al reaccionar con ácidos. Así, al reaccionar con ácidos inorgánicos fuertes tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido bromhídrico y ácido fosfórico, forma las correspondientes sales de amina. Igualmente, al reaccionar con ácidos
10 orgánicos se forman las sales de antibiótico 235S₃ y el ácido orgánico correspondiente.

La naturaleza básica del Antibiótico 235S₃ es también una característica distintiva de este nuevo compuesto. Así cuando una muestra de Antibiótico 235S₃ se titula potenciométricamente con ácido clorhídrico 0.1N, se observan dos grupos básicos de fijación. La primera fijación se produce a un
15 pH de aproximadamente 5.5. La segunda neutralización ocurre a un pH de aproximadamente 8.5. Esta titulación indica un pK_a de aproximadamente 7.5 y un peso molecular de 373.

20 El Antibiótico 235S₃ produce una reacción negativa bajo las condiciones de la prueba del Biuret. En hidrólisis a reflujo con ácido clorhídrico 6N, el producto de la hidrólisis es un α-aminoácido que tiene un R_f de 0.52 por cromatografía en papel, usando un sistema de solventes consistente en
25 100 partes de butanol, 12 partes de ácido acético glacial y 100 partes de agua y el reactivo ninhidrina para localizar la mancha del aminoácido en el cromatograma. Este aminoácido tiene un punto de fusión de 240-241° C.

30 El Antibiótico 235S₂, por otra parte, da una prueba de Biuret positiva, indicando la presencia de enlaces amídicos. En hidrólisis a reflujo con ácido clorhídrico 6N se obtiene una mezcla de aminoácidos, uno de los cuales da un R_f de

304651

30



0.52 efectuando el ensayo de papel cromatográfico empleado para el producto de hidrólisis del Antibiótico 235S₃.

Una determinación osmométrica del peso molecular del Antibiótico 235S₃ señala un valor de 322 que, considerado conjuntamente con los datos microanalíticos, indica una fórmula molecular de acuerdo con la siguiente C₁₇H₂₈N₃O₃. En vista de que el peso molecular, determinado por el osmómetro, es una medida de una propiedad coligativa de la molécula, se le considera un medio de estimación del peso molecular más seguro que el del análisis volumétrico, susceptible de error en presencia de pequeñas cantidades de ácidos fuertes o impurezas básicas.

La sustancia antibiótica 235L, segunda del par sinérgico de antibióticos incluido en el Antibiótico 235A, ha sido también preparada en forma cristalina por los métodos que a continuación se describen. Las soluciones del antibiótico 235L tienen un único máximo en la región de absorción ultravioleta a 282 milimicrones (E₁% = 47). El orden de fusión del antibiótico es de 220-230° C con descomposición.

El Antibiótico 235L contiene los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno. El siguiente es un análisis de la composición elemental obtenida en una muestra de Antibiótico 235L cristalino:

	Carbono -----	51.1
25	Hidrógeno -----	7.4
	Nitrógeno -----	10.4
	Azufre -----	0.2
	Oxígeno (por diferencia) -----	24.9

El contenido en carbohidratos de la molécula 235 L, determinado por el método del orcinol de H.F.Weiner y J.R.Moghim (Arch. Biochem. & Biophys. 92) 97 (1952), es nulo. Cuando se empleó la prueba modificada de Molisch (Bische Z., Mikroche-



304
mie 7, 33 (1929)7, se encontró que la molécula 235L contenía menos del 1.0% de hexosa.

El peso molecular relativamente grande del Antibiótico 235L queda indicado por el hecho de que no es dializable a través de una membrana de celofán. Una determinación del peso molecular por ultracentrifugación indica un peso molecular de aproximadamente 60.000.

El Antibiótico 235L, al someterlo al procedimiento de electroforesis de disco en un gel de poliacrilamida 7.5%, según el procedimiento descrito por Reisfeld et al. en Nature 195, 281 (1962), se separa en bandas según una forma característica. El gel de poliacrilamida al 7.5% es suspendido en una columna con buffer de fosfatos pH 8.7, aplicándose en el extremo de la columna 0.01 ml. de una solución de Estreptoavidina. Se efectúa la electroforesis durante 1 hora a 5 miliamperios y 100 voltios. El procedimiento es también llevado a cabo con Avidina, una proteína previamente conocida, de aproximadamente el mismo peso molecular. Las bandas descubiertas por el procedimiento de electroforesis son teñidas con azul de bromofenol. Las bandas resultantes de la electroforesis del Antibiótico 235L (Estreptoavidina) muestran la presencia de cantidades mayores de dos proteínas y cantidades menores de dos proteínas diferentes que se mueven íntimamente unidas hacia el ánodo. El resultado obtenido con la electroforesis de Avidina muestra seis bandas ampliamente separadas, de las cuales solamente dos componentes menores están en la región del Antibiótico 235L.

El Antibiótico 235L parece ser un compuesto de tipo polipéptido o parecido a proteína, ya que de la hidrólisis ácida a elevadas temperaturas resultan unos productos que dan reacción positiva con la ninhidrina indicando rupturas de enlaces amídicos. El Antibiótico 235L tiene sólo una solubili-



30451

dad limitada en agua, de menos de 1 miligramo por mililitro, aproximadamente. Sin embargo, la solubilidad en agua puede ser incrementada hasta 10 miligramos por mililitro mediante la adición de cantidades variables de cloruro de sodio a la solución.

El Antibiótico 235A es activo en la inhibición del crecimiento de los gérmenes Gram-negativos. Aunque los componentes aislados del Antibiótico 235A, por ejemplo, los Antibióticos 235S y 235L, cuando son puestos a prueba solos en sistemas de ensayo corriente, resultan ineficaces para la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, la combinación de los dos, como Antibiótico 235A, actúa sinérgicamente. Así, el Antibiótico 235A, como una mezcla de partes iguales de 235S y 235L, es eficaz en la inhibición del crecimiento de Salmonella typhose 2866, Salmonella Schottmuelleri MI, Escherichia coli W y Shigella sonnei 1832.

El Antibiótico 235A es una sustancia relativamente atóxica. Usando ratones como animales de prueba, dosis elevadas, de 500 mg/Kg del componente 235S y 400 mg/Kg del componente 235L fueron toleradas cuando se inyectaron intraperitonealmente al ratón, sin que se observasen manifestaciones tóxicas.

El nuevo antibiótico 235A, resulta útil como agente para inhibir el crecimiento de los organismos patógenos Gram-negativos. Es también útil para la obtención de cultivos puros de microorganismos en que un organismo susceptible puede ser separado de otro resistente. Cuando el Antibiótico 235A es separado en sus componentes individuales, 235S y 235L, los componentes individuales pueden ser utilizados como auxiliares en la búsqueda de otras sustancias similares. Así, el 235S actúa como un inhibidor del crecimiento de microorganismos en medios que no contienen biotina exógena, pero es completamente



304054

inactivo, en sistemas que contengan sustancias biotino-activas, para la inhibición del crecimiento de microorganismos. De esta manera, el Antibiótico 235S₃ puede ser utilizado en sistemas de ensayo microbiológico para comprobar la presencia
5 de biotina o sustancias biotino-activas.

El Antibiótico 235L, por el contrario, actúa como un agente complejante de la biotina y, así, permite al Antibiótico 235S actuar como un inhibidor del crecimiento de microorganismos patógenos. El Antibiótico 235L, es por tanto
10 una eficaz herramienta de laboratorio que puede ser utilizada en la búsqueda de muestras desconocidas de microorganismos en cuanto a su capacidad para producir antibióticos que actúan primariamente por inhibición de síntesis de biotina en diversos microorganismos patógenos.

La actividad antibiótica del Antibiótico 235A es determinada por el método de difusión en agar o el método de ensayo de dilución en tubo, usando un cultivo Escherichia coli en crecimiento en un medio natural. El ensayo del 235A es complicado por el hecho de estar compuesto por una sustancia de
15 alto peso molecular y lenta difusión y por sustancias de bajo peso molecular y rápida difusión. Como resultado, los ensayos ordinarios de difusión en agar miden solamente la cantidad del componente de difusión lenta, ya que la sustancia de difusión rápida no es activa por sí sola en los ensayos ordinarios. Una vez que los dos tipos de sustancias han sido separados, es posible preparar placas de ensayo con adición a
20 las mismas de la suficiente cantidad, 90 γ /ml., del compuesto de alto peso molecular, de manera que su difusión no limite la actividad de los componentes pequeños. El método de difusión de agar se realiza de la siguiente manera:
30

Un matraz conteniendo 150 ml. de un medio de ensayo compuesto por extracto de carne de vaca, 0,3%; peptona 0,5%;



304951

extracto de levadura 0,2%; agar, 1,9% y agua a volumen, es esterilizada en autoclave durante 20 minutos a 120° C. y 18 libras /pulgada cuadrada. El agar líquido mantenido a 45-50° C se inoculara con 5 ml. de un cultivo en caldo nutritivo, incubado durante la noche a 37° C, de Escherichia coli W que ha sido ajustado a una densidad celular de 60 en un colorímetro Iu metron, usando un filtro de 500 mμ. A continuación 5 ml. del agar sembrado son depositados, por medio de una pipeta, en una placa de plástico estéril, de 90 mm., permitiéndose su solidificación. Después de la solidificación, la placa se conserva refrigerada hasta su uso dentro de las siguientes 24 horas.

En la realización del ensayo, un disco de papel, de 12,7 mm., es mojado con la solución antibiótica y, a continuación, escurrido en papel secante y colocado en la superficie de una placa de agar sembrado con Escherichia coli W. Las placas son incubadas, a 25°, durante 18-24 horas. La potencia del antibiótico se determina entonces por medición de la zona de inhibición alrededor del disco en milímetros.

El ensayo de dilución en tubo se realiza de la siguiente manera: Se hace una solución mediante la adición de 32 gramos de un Caldo Base Rojo Fenol Difco y 20 gramos de dextrosa a 1000 ml. de agua destilada. Se añaden dos mililitros de la solución a un tubo de ensayo. Se preparan también otros nueve tubos de ensayo conteniendo, cada uno, dos mililitros de la anterior solución diluida con 2ml. de agua. Se añaden dos mililitros de la solución antibiótica al primer tubo y se mezclan. Dos mililitros de la solución resultante son a continuación transferidos al segundo tubo y mezclados. Dos mililitros de este segundo tubo son transferidos al tercer tubo y mezclados. Esta operación se repite con los diez tubos y del último se extraen dos mililitros de la solución resultante, que se desechan. A cada uno de los diez tubos se añade una go-



304651

ta del inoculum Lumetron 60, preparado, según queda descrito, con una pipeta serológica de 5 ml. Los tubos son después incubados al baño de María, a 37°, durante 2 horas aproximadamente hasta que el tubo de control (con nutrientes a mitad de
5 concentración y sin antibiótico) ha cambiado su color rojo original a un amarillo neto. La serie de diez tubos es entonces examinada y el tubo con la más alta dilución, que es todavía de color rojo, se considera que contiene la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antibiótico.

10 La presencia de Antibiótico 235L puede ser determinada por los métodos habituales de difusión agar usando Escherichia coli, siempre que se incorpore al agar la suficiente cantidad de Antibiótico 235S. A causa del alto peso molecular y, en consecuencia, cambios pequeños de pendiente en la dilu-
15 ción, este método carece de precisión. Con agar nutritivo ordinario, se ha averiguado que la presencia de 0,6 mg/ml. de Antibiótico 235S produce resultados satisfactorios.

La cantidad de antibiótico 235L, puede ser determinada con un poco más de precisión mediante el empleo del ensa-
20 yo usual de dilución en tubo con Escherichia coli, añadiendo un exceso de Antibiótico 235S (100%) al medio de ensayo. El resultado es expresado como γ /ml. requeridas para la concentración inhibitoria mínima (CIM).

El Antibiótico 235S puede ser determinado cuantitativamente en placas de difusión de agar usando Escherichia coli.
25 Si se emplea agar nutritivo, resulta suficiente con 90% de Antibiótico 235L por ml. de agar. Si se emplea un medio de ensayo sintético, no se necesita Antibiótico 235L.

En este último caso, es inhibida la actividad si se
30 incorpora biotina al agar. Este método se usa para confirmar la producción de antibióticos del tipo 235 por cultivos obtenidos en el programa de investigación de antibióticos.



1964

304051

El Antibiótico 235S puede ser también determinado por métodos de dilución en tubo en presencia de un exceso de Antibiótico 235L.

5 En el ensayo de dilución en tubo la concentración inhibitoria mínima de los componentes antibióticos es 0.5 γ /ml. para el antibiótico 235L, 25 γ /ml. para el antibiótico 235S₂ y 31 γ /ml. para el Antibiótico 235S₃.

10 La producción del nuevo Antibiótico 235A es llevada a cabo por la fermentación aerobia sumergida de diversas clases de Streptomyces lavendulae o Streptomyces avidinii en medios acuosos convenientes. Medios acuosos tales como los que resultan útiles para la producción de otros antibióticos conocidos son, en general, adecuados para la producción del Antibiótico 235A. Tales medios contienen fuentes de carbono y nitrógeno asimilables por el microorganismo y ciertas sales inorgánicas esenciales para el rápido desarrollo de los microorganismos. Además, el medio de fermentación contiene indicios de metales, necesarios para el crecimiento del microorganismo, que están habitualmente presentes en múltiples fuentes de carbono y nitrógeno del medio.

15 Generalmente, carbohidratos tales como azúcares, por ejemplo, dextrosa, sacarosa, dextrina y sus similares, constituyen fuentes adecuadas de carbono asimilable. La cantidad exacta de la fuente de carbono dependerá, en parte, de los otros ingredientes del medio, pero frecuentemente se ha averiguado que una cantidad de carbohidrato de entre 1 y 6% por peso, del medio es satisfactoria. Estas fuentes de carbono pueden ser utilizadas individualmente o combinando varias de ellas en el medio.

20 30 Varias fuentes de nitrógeno, tales como hidrolizados de caseína, aminoácidos, por ejemplo esparraguina, glicina, arginina, digeridos de harina de soja, harina de soja, solubles



304051

de destilería y sus similares son fácilmente asimilados por los microorganismos productores del Antibiótico 235A y pueden ser usados en medios de fermentación para la producción de este antibiótico. En general, estimamos que fuentes orgánicas de nitrógeno, particularmente la harina de soja, son muy satisfactorias para la producción del nuevo antibiótico. Las diversas fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno pueden ser usadas, bien solas, bien en combinación, en cantidades que oscilan de 0,2 a 6% aproximadamente, por peso del medio acuoso.

Los siguientes son ejemplos de medios adecuados para el crecimiento de los cultivos de Streptomyces avidinii MA-833 y Streptomyces lavendulae que producen el Antibiótico 235A.

15

Medio nº 1

Extracto de levadura	1 %
Dextrosa	1 %
Agar	2 %

disueltos en agua.

20

Medio nº 2.

Peptona Bacto	0.5 %
Extracto de carne	0.3 %
Dextrosa	1 %
Extracto de levadura	0.1 %

25 disueltos en agua. El pH de la solución es ajustado a 7.0

Medio nº 3.

Dextrosa	1 %
Esparraguine	0.1 %
K_2HPO_4	0.01%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05%
Extracto de levadura	0.05%
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	300 γ /L

30



304051

	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	Y/L
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	45	Y/L
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	27	Y/L
	$(\text{NH}_4)_6\text{M}_2\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	19	Y/L
5	Acido Bórico	55	Y/L
	CaCl_2	1	mg/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	Y/L

disueltos en agua. El pH de la solución es ajustado a 7.0

Medio nº 4

10	Dextrosa	10.0 g.
	Dl.-Esparraguina	1.0
	K_2HPO_4	0.1
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
15	Extracto de levadura	0.5
	Agua destilada	1000 ml.

El pH de la solución es ajustado a 7.2

Medio nº 5

	Harina de soja	30.0 g.
20	Solubles de destilería	7.5
	Cerelesa	20.0
	NaCl	2.5
	CaCO_3	10.1
	Agua destilada	1000 ml.

25 El pH de la solución es ajustado a 7.0

Una vez terminada la fermentación, se recupera el an
 tibiótico del caldo de fermentación poniendo en contacto el
 caldo filtrado con una resina de cambio de cationes fuertemen-
 te ácida. Un típico ejemplo de la resina de cambio de cationes
 30 usada en la recuperación de Antibiótico 235A es la DOWEX 50 X 2
 que contiene un copolimero de benzeno diivinil estireno con gru-
 pos sulfónicos sustituidos en toda la matriz de la resina. En



304651

contacto el caldo de fermentación con la resina de cambio de cationes, la porción mayor de Antibiótico 235S (el componente de menor peso molecular) es absorbida por la resina junto con una cantidad menor de Antibiótico 235L. La porción mayor del
5 Antibiótico 235L pasa a través de la resina y es recuperada del efluente por procedimientos que a continuación se describen.

El efluente de la resina contiene Antibiótico 235L que es recobrado en forma cruda por precipitación con sulfato
10 amónico. El Antibiótico crudo 235L es posteriormente purificado por nueva precipitación de una solución acuosa, usando acetona o etanol como precipitante. El precipitado crudo puede ser también alternativamente purificado por diálisis de una solución acuosa del material crudo, seguida de precipitación del
15 Antibiótico 235L, parcialmente purificado, del residuo de la diálisis, usando acetona como agente precipitante. El Antibiótico 235L es también aislado del residuo de la diálisis por cromatografía a través de una columna Sephadex G,25, a fin de eliminar la sal residual, sometiéndolo más tarde a nueva cro-
20 matografía y usando dietilamino-etil-celulosa como adsorbente. El Antibiótico 235L es recuperado del efluente de la columna de dietilamino-etil-celulosa por evaporación parcial y refrigeración para cristalizar el material antibiótico.

El Antibiótico 235S es recuperado del adsorbato de
25 resina de cambio de iones por elución de la resina con amoníaco diluído. El eluato de amoníaco de la resina, que contiene Antibiótico 235S crudo, mezclado con una pequeña cantidad del Antibiótico 235L, es purificado posteriormente de acuerdo con un procedimiento de readsorción en resina de cambio de iones
30 DOWEX W 50 X. En la elución del Antibiótico 235S, readsorbido de la resina con amoníaco diluído, se obtiene Antibiótico 235S cristalino por concentración de fracciones seleccionadas y



cristalización de mezclas de agua/acetona a pH alcalino.

Alternativamente, el eluato DOWEX W 50 X, que contiene Antibiótico 235S, puede ser aún purificado por extracción con alcohol butílico y readsorción del extracto en resina DOWEX W 50 X. El material cristalino se obtiene entonces de las fracciones seleccionadas del eluato en concentración.

Ejemplo I

Se prepara un medio de fermentación con la siguiente composición, ajustando el pH a 7.0:

10	Dextrosa	1%	
	Esperraguina	0.1%	
	K_2HPO_4	0.01%	
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05%	
	Extracto de levadura	0.05%	
15	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	300	γ/L
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	250	γ/L
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	45	γ/L
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	27	γ/L
	$(NH_4)_6MgO_{24} \cdot 2H_2O$	19	γ/L
20	Acido bórico	55	γ/L
	$CaCl_2$	1	mg/L
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250	γ/L

disueltos en agua.

Aproximadamente 1.000 galones de un medio acuoso de la citada composición son esterilizados e inoculados con un inóculo vegetativo de cultivo de Streptomyces avidinii MA 833. El inóculo vegetativo es preparado de la siguiente manera: Un medio acuoso estéril -cuya composición está formada por 1% de extracto de levadura y 1% de dextrosa en agua- es inoculado con el contenido de un tubo liofilizado de Streptomyces avidinii MA 833 viable. Se preparan tubos de agar inclinado de esta suspensión de microorganismos y, después de un desarrollo du-



rante 4-5 días a 28° C., las esporas desarrolladas son recogidas en una suspensión de medio acuoso estéril consistente en 0.1% de extracto de levadura, 1% de dextrosa, 0.5% de peptona Bacto y 0.3% de extracto de carne. La suspensión de esporas así preparada se añade entonces a un matraz Erlenmeyer con rompientes de dos litros, que contiene 500 ml. del medio acuoso estéril nº 2. El medio inoculado es entonces incubado a 28° en un agitador rotatorio durante 24 horas aproximadamente en el curso de las cuales se forma un denso crecimiento vegetativo del cultivo.

El cultivo vegetativo, preparado en la forma indicada, es entonces añadido a un fermentador que contiene aproximadamente de 30 a 40 galones de un medio estéril con la composición descrita como Medio nº 2. El medio inoculado es a continuación incubado a 28° C durante 48 horas aproximadamente, en el curso de las cuales el medio es vigorosamente agitado y aireado para formar un denso crecimiento vegetativo del cultivo.

Aproximadamente un 8.4% del cultivo vegetativo preparado en la forma indicada es añadido a 120 galones de un medio estéril con la composición descrita en el Medio nº 2 y el medio inoculado incubado a 28° C, durante unas 26 horas, en el curso de las cuales el medio es agitado y vigorosamente aireado.

El contenido antibiótico del caldo de fermentación, es seguido por el método de ensayo de difusión en agar o de ensayo de dilución en tubo, empleando el organismo Escherichia coli, según se ha descrito. Cuando la actividad antibiótica alcanza un máximo de 24, a las 60 horas aproximadamente, la fermentación ha terminado y el caldo de fermentación es recogido del fermentador.

Aproximadamente 120 galones del caldo de fermentación preparado según se ha descrito es filtrado y las células descartadas. El filtrado conteniendo la actividad antibiótica es ajustado.



tado a pH 5 y filtrado a través de una columna que contenga 8 litros de DOWEX W 50 X una resina de cambio de cationes fuertemente ácida con una matriz de benzeno divinil estireno cuya capacidad de cambio se deriva de la presencia de grupos de ácido sulfónico contenidos en la matriz de la resina) en ciclo sódico a una velocidad de flujo de aproximadamente 800 mls. por minuto. A continuación de la adsorción de la actividad antibiótica en la resina, ésta es lavada con agua y eluida usando hidróxido amónico 0.5N, a una velocidad de elución de 250 mls. por minuto. La principal cantidad de la actividad antibiótica es recogida en aproximadamente cuatro fracciones de dos litros de eluato que contiene una cantidad mayor de Antibiótico 235S y una cantidad menor de Antibiótico 235L.

Las segunda y tercera fracciones son combinadas y el pH ajustado a 7.5, a continuación de lo cual son evaporadas a un volumen de aproximadamente 440. mls. Aproximadamente 90 mls. de este eluato concentrado de DOWEX W 50 X es dializado en una bolsa de celofán, usando tres volúmenes de un litro de agua como liquido de diálisis. Los dializados son entonces reunidos y evaporados a aproximadamente 80 mls. Ni el dializado concentrado ni el residuo de diálisis tienen actividad antibiótica alguna cuando fueron experimentados contra el Escherichia coli en el ensayo de dilución en tubo, pero en una nueva combinación del residuo y del dializado, la combinación resultante tiene una actividad antibiótica en el mismo ensayo de dilución en tubo del Escherichia coli.

Ejemplo 2

Sesenta mls. de un eluato concentrado de DOWEX W 50 X, preparado según se describe en el Ejemplo 1, es cromatografiado en una columna de 1 litro de Sephadex 2b, empleando agua destilada como disolvente de desarrollo para el cromatograma. Los 360 mls. iniciales de volumen del afluente son descartados, a



continuación de lo cual se recogen 27 fracciones de 25 mls.cada una. No existe actividad antibiótica en ninguna de las fracciones recogidas cuando se experimentaron por el ensayo de placas de agar con Escherichia coli.

5 Se preparan dos concentrados de eluato por combinación de las fracciones 1-9, inclusive, y fracciones 17-20, inclusive. Las fracciones 1-9, inclusive, son concentradas a 20 mls. y contienen solución concentrada de Antibióticos 235L que es recuperada por liofilización. Las fracciones 17-20, inclusive,
10 son evaporadas a 10 mls. y el Antibiótico 235S, parcialmente purificado, es recuperado en forma sólida por liofilización del concentrado.

 El mencionado experimento de cromatografía es repetido usando 60 mls. del mismo eluato concentrado de DOWEX W 50 X
15 como material de partida. Las fracciones 8 y 9 del eluato de la columna cromatográfica son reunidas y concentradas. Después de permanecer en reposo, el Antibiótico 235L cristaliza de la solución y es recobrado por filtración.

Ejemplo 3.

20 Mil veinte galones de caldo de fermentación filtrado preparado de acuerdo con la descripción del Ejemplo 1, es adsorbido por paso a través de resina DOWEX W 50 X 2 y el adsorbato de resina eluido con una solución de hidróxido de amonio 0.5N. Una fracción de 2.6 litros del eluato (1/16 del volumen total)
25 es ajustada a pH 9 usando una solución de hidróxido sódico acuoso y extraída con tres porciones de 6 litros de alcohol n-butílico. El extracto de alcohol n-butílico es diluido con agua y evaporado in vacuo a un volumen de 2.800 mls. Un litro del concentrado de alcohol n-butílico es después evaporado a un volumen de 40 mls. y cromatografiado por una columna de cromatografía Sphadex 25 (dextrano) de dos litros. Los efluentes de la columna, con un contenido elevado en sólidos totales, son ajusta-



dos a pH 3.8 y adsorbidos en 50 mls. de resina DOWEX W 50 X 2 a la velocidad de 1 ml. por minuto. El adsorbato de resina resultante es eluido con una solución de hidróxido de amonio 0.2N recogiéndose fracciones de eluato amoniacal con un volumen cada una de 25 ml. Las fracciones núms.11 y 12, que comprenden 50 mls. son evaporadas a aproximadamente la mitad del volumen y diluidas con 96 mls. de acetona para inducir a la cristalización. Los cristales así obtenidos son Antibiótico 235S₃ en forma prácticamente pura.

10 Las fracciones núms.6-10, inclusive, de eluato de resina, son reunidas y concentradas a aproximadamente 20 mls., añadiéndose 120 mls.de acetona para inducir a la cristalización. Los 1.2 gramos de cristales resultantes se ha visto que consisten en una mezcla de Antibiótico 235S₃ y Antibiótico 235S₂ en una proporción aproximada de 9:1.

Ejemplo 4.

Aproximadamente 1.000 galones de caldo de fermentación filtrado, preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, son pasados a través de unos 80 litros de resina DOWEX W 50 X 2. El efluente de la adsorción de la columna de resina es tratado con sulfato de amonio en la proporción de 500 g. de sulfato de amonio por litro de efluente y el precipitado resultante separado por filtración. El precipitado es disuelto en aproximadamente 9 galones de agua y dializado con bolsas de celcfán durante unas 24 horas. El residuo de la diálisis es diluido con 1,5 volúmenes de acetona para precipitar un material crudo que comprende Antibiótico 235L. El precipitado crudo es disuelto en agua, precipitado nuevamente con alcohol etílico y secado. Aproximadamente 50 gramos del sólido así preparado son suspendidos en agua y centrifugados y la solución supernadante es cromatografiada a través de 5.5 litros de Sephadex 25, usando agua destilada como disolvente para el



desarrollo. Aproximadamente 1550 mls. de solución que contiene Antibiótico 235L prácticamente puro es recogida y desecada por congelación. Un gramo de los sólidos así preparados es disuelto en 25 mls. de dietilaminoetil-celulosa. El efluente combinado es concentrado a aproximadamente 5 mls. y enfriado, obteniéndose así cristales substancialmente puros de Antibióticos 235L, con un punto de fusión de 225-229° C.

N O T A

Descrito suficientemente el objeto de la presente patente de invención, que se acoge a los beneficios de la prioridad de la Patente de Invención norteamericana nº 313.477, depositada en la Oficina norteamericana de patentes el día 3 de octubre de 1.963, se declara que lo que constituye su esencia es lo que se concreta en las siguientes reivindicaciones:

15 1ª.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibióticos, que comprende el cultivo de un microorganismo productor de Antibiótico 235A, del género *Streptomyces*, en un medio nutriente acuoso, hasta que se produce una actividad antibiótica substancial que pasa a dicho medio nutriente.

20 2ª.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibióticos, que comprende el cultivo de un microorganismo productor de Antibiótico 235A, seleccionado entre los del grupo consistente de *Streptomyces lavendulae* y *Streptomyces avidinii*, en un medio nutriente acuoso, hasta que se produce una actividad antibiótica substancial que pasa a dicho medio nutriente.

25 3ª.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibióticos, según la reivindicación 2ª, en el que el microorganismo usado es *Streptomyces avidinii* MA-833.

30 4ª.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibióticos, según la reivindicación 2ª, en el que el microorganismo usado es *Streptomyces lavendulae* MA-669.

5ª.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibióti



1651

cos, que comprende el cultivo de un microorganismo productor de Antibiótico 235A, seleccionado entre los del grupo consistente de Streptomyces lavendulae y Streptomyces avidinii, en un medio nutriente acuoso, hasta que se produce una actividad antibiótica substancial que pasa a dicho medio nutriente y la recuperación de Antibiótico 235A de dicho medio nutriente acuoso.

5
10
6^a.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibióticos, que comprende el contacto de una solución acuosa de Antibiótico 235A con las partículas de una resina de cambio de cationes fuertemente ácida para formar un adsorbato de resina de Antibiótico 235A, la elución de dicho adsorbato de resina antibiótica con amoníaco y la recuperación de Antibiótico 235A del eluato resultante.

15
20
7^a.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibióticos, que comprende el contacto de una solución acuosa de Antibiótico 235A con partículas de una resina de cambio de cationes fuertemente ácida para formar un adsorbato de resina de Antibiótico 235A, la elución de dicho adsorbato de resina antibiótica con hidróxido de amonio, someter el eluato resultante a cromatografía con dextrano, la elución del cromatograma de dextrano con agua y la recuperación de Antibiótico 235S y Antibiótico 235L de las fracciones del eluato seleccionadas por separado.

25
30
8^a.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibióticos, que comprende el contacto de una solución acuosa que contenga una mezcla de Antibióticos 235S y Antibiótico 235L con partículas de una resina de cambio de cationes fuertemente ácida para formar un adsorbato de resina de Antibiótico 235S, la elución de dicho adsorbato de resina antibiótica con hidróxido de amonio, la diálisis del eluato resultante y la recuperación de Antibióticos 235S del dializado resultante.

9^a.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibió-

304651



964

5 ticos, que comprende el contacto de una solución acuosa de an
tibiótico 235A con partículas de una resina de cambio de ca-
tiones fuertemente ácida para formar un adsorbato de resina
de Antibiótico 235A, la elución de dicho adsorbato de resina
10 antibiótica con hidróxido de amonio, el contacto del eluato a
moniacal resultante con partículas de una resina de cambio de
cationes fuertemente ácida para formar un adsorbato de resina
antibiótica, la elución del adsorbato de resina antibiótica
con hidróxido de amonio diluido y la recuperación de antibió-
tico 235S de fracciones seleccionadas del eluato de la resina.

10^a.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibió-
ticos, que comprende el contacto de una solución acuosa de An-
tibiótico 235S con partículas de una resina de cambio de catio-
nes fuertemente ácida para formar un adsorbato de resina de An
15 tibiótico 235S, la elución de dicho adsorbato de resina anti-
biótica con hidróxido de amonio, la extracción del eluato re-
sultante con alcohol n-butílico y la recuperación de Antibióti-
co 235S del extracto de alcohol n-butílico resultante.

20 11^a.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibió-
ticos, que comprende el contacto de una solución acuosa que
contenga una mezcla de Antibiótico 235L y Antibiótico 235S con
partículas de una resina de cambio de cationes fuertemente áci-
da para formar un adsorbato de resina antibiótica, la elución
de dicho adsorbato de resina con amoníaco, la diálisis del elu-
25 ato resultante, con la cual se eliminan, de la solución de diá-
lisis, las impurezas de bajo peso molecular, permaneciendo el
Antibiótico 235L en el residuo de diálisis y la recuperación
del Antibiótico 235L del residuo de diálisis.

30 12^a.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibió-
ticos, que comprende el contacto de una solución acuosa que
contiene una mezcla de Antibiótico 235L y Antibiótico 235S con
partículas de una resina de cambio de cationes fuertemente áci



304051

da, la separación de la resina de cambio de cationes de la solución acuosa efluente y la recuperación del Antibiótico 235L de la solución efluente.

13^a.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibió-
5 ticos, según la reivindicación 12^a, en el que la solución efluente es puesta en contacto con sulfato de amonio para precipitar el Antibiótico 235L en forma sólida cruda, recuperando el Antibiótico 235L sólido crudo de la solución.

14^a.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibió-
10 ticos, que comprende el contacto de una solución acuosa que contenga una mezcla de Antibiótico 235S y Antibiótico 235L con partículas de una resina de cambio de cationes fuertemente ácida para formar un adsorbato de resina antibiótica, la separación de dicho adsorbato de resina de la solución efluente, el
15 contacto de dicha solución efluente acuosa con sulfato de amonio para precipitar el Antibiótico 235L crudo, la disolución en agua de dicho Antibiótico 235L precipitado, la diálisis de la solución acuosa resultante para eliminar las impurezas de bajo peso molecular, el contacto del residuo de diálisis resul-
20 tante por adición de acetona, precipitando así el Antibiótico 235L sólido, la formación de una solución acuosa de dicho antibiótico sólido, someter dicha solución acuosa a cromatografía en columna de dextrano y la recuperación de Antibiótico 235L cristalino de fracciones seleccionadas del eluato.

25. 15^a.-Procedimiento de fermentación de nuevos antibió-
ticos.

Todo según se describe y reivindica en la presente Memoria descriptiva que consta de treinta y cinco hojas, debi-
damente foliadas y escritas a máquina por una sola de sus ca-
30 ras.

Madrid, a tres de octubre de mil novecien

tos sesenta y cuatro.

304651



EL AGENTE:

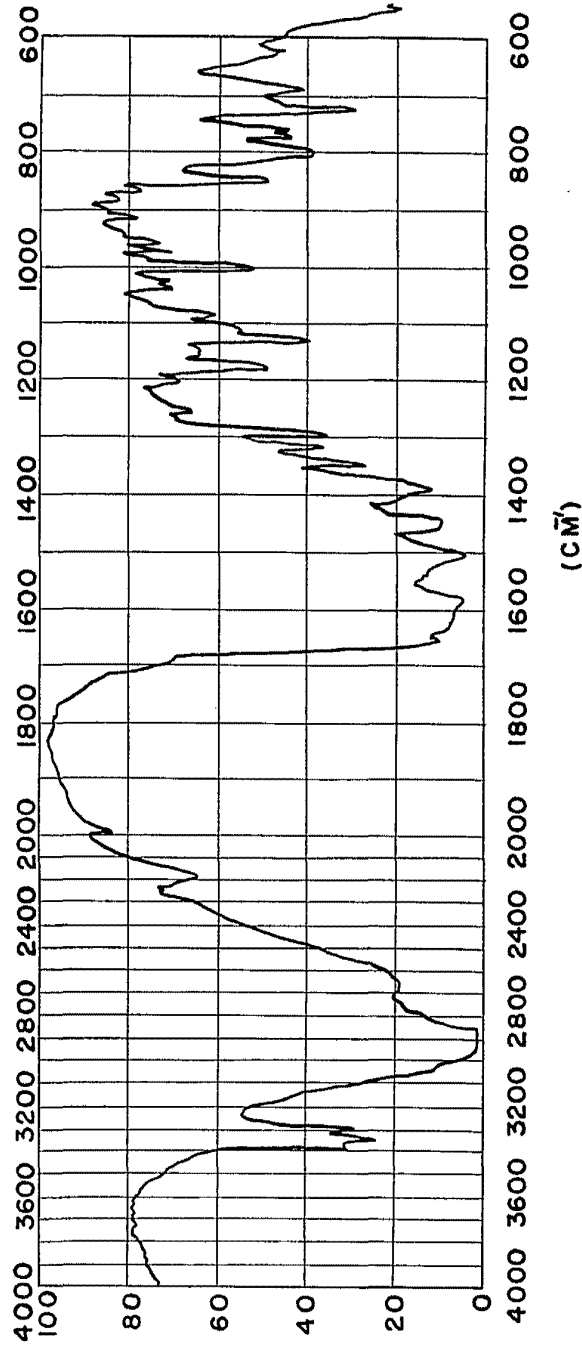
P. P. Amputal

30465

30465

Fig. 1.

235S₃



ESCALA VARIABLE

Madrid, 3 octubre 1964

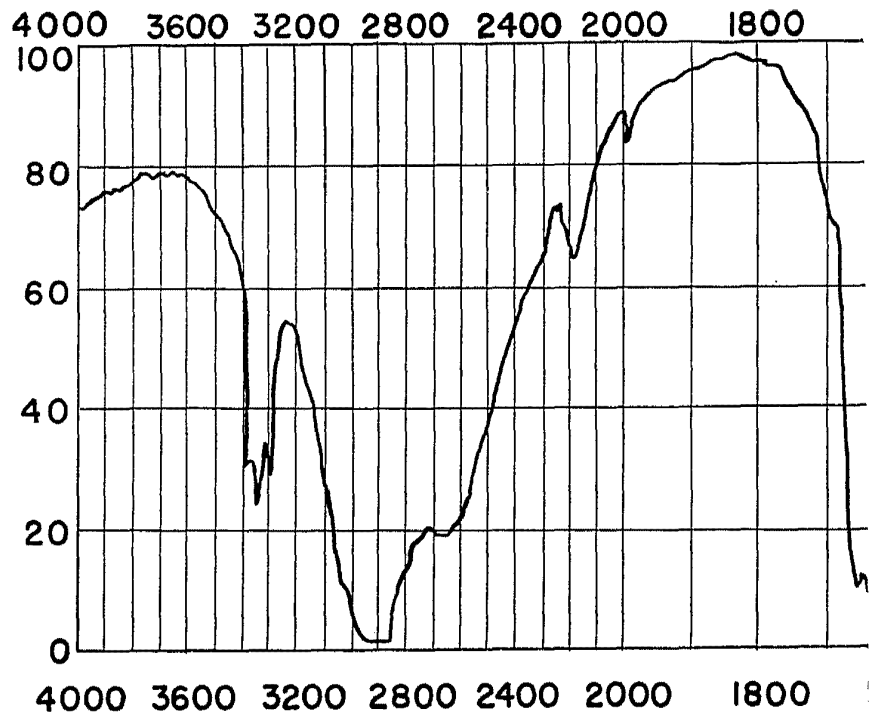
El Agente,

R. P. J. *[Signature]*

30465

Fig. 1.

235

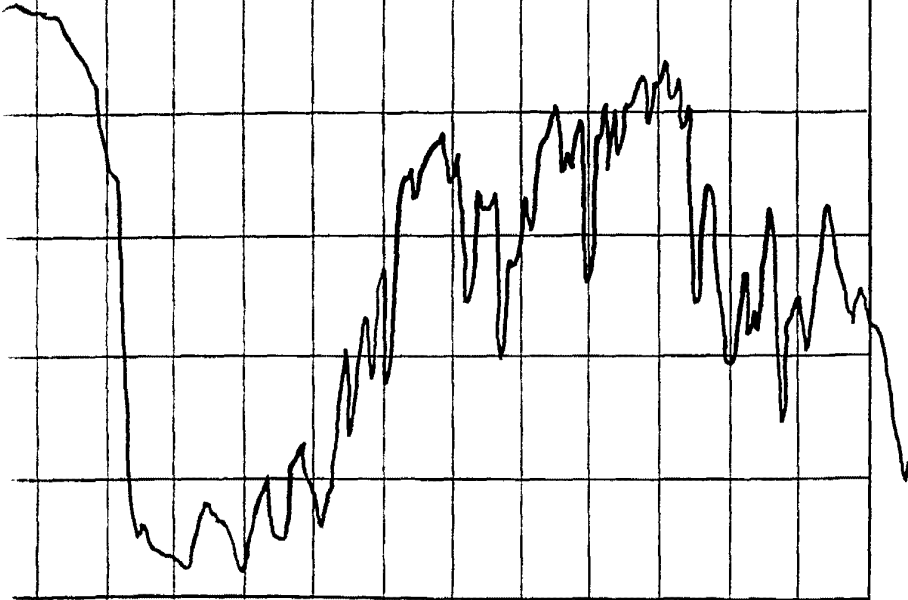


30465

□. 1.

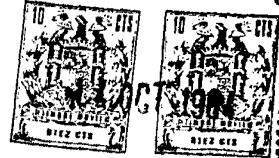
235S₃

1800 1600 1400 1200 1000 800 600



1800 1600 1400 1200 1000 800 600

(CM⁻¹)



ESCALA VARIABLE

MADRID, 3 octubre 1.964

El Agente,

P.P.

[Handwritten signature]