

311094

11 JUN 1965

P.- 28.932



Nº 67.706  
U.S. Serial Nº 351.409  
Case X 2771

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

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

formulada el 27 de Marzo de 1.965, con el número 311.094

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

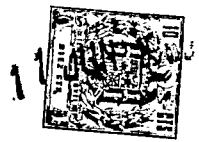
a nombre de ELLI LILLY AND COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 740 South Alabama Street, Indianápolis, Indiana, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN CONCENTRADO O COMPOSICION DE PIENSOS"

Este invento concierne a un nuevo agente antibiótico denominado aquí por el nombre arbitrario de antelvincina, y a sus sales, y a la preparación de éstos, que son particularmente útiles para formular composiciones para piensos.

La antelvincina es un compuesto nitrogenado básico producido cultivando bajo condiciones controladas determinadas cepas hasta ahora no descritas del actinomiceto "Streptomyces venezuelae". En forma de base libre, la antelvincina es relativamente inestable; consecuentemente,

311094



se emplea preferiblemente en forma de, y es caracterizada por medio de, sus sales de adición con ácidos orgánicos o inorgánicos. Especialmente apropiadas para fines de caracterización son sus sales con ácido 2-naftaleno sulfónico y ácido salicílico.

Más particularmente, el presente invento crea un compuesto del grupo consistente en el antibiótico antelvincina y en sus sales de adición de ácido, siendo caracterizado dicho antibiótico en la forma de su sal de adición de 2-naftaleno sulfonato, por las diversas propiedades seguidamente mencionadas.

El invento crea también un concentrado o composición para piensos, que contiene un nuevo antibiótico de este invento, tal como se define anteriormente.

El invento crea también un procedimiento para producir antelvincina que comprende cultivar un organismo seleccionado entre el grupo consistente en "Streptomyces venezuelae" ATCC 14.583, "Streptomyces venezuelae" ATCC 14.584 y "Streptomyces venezuelae" ATCC 14.585 en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno, y sales inorgánicas, bajo condiciones aerobias sumergidas hasta que se produce una cantidad sustancial de antelvincina por dicho organismo en dicho medio de cultivo.

Otra creación más del invento es el método de tratar la helmintiasis que comprende administrar a sujeto parasitado una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto seleccionado entre el grupo consistente en antelvincina y las sales de adición de ácido de ésta con ácidos fisiológicamente aceptables.



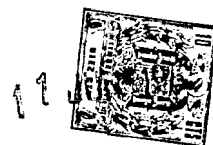
La sal de 2-naftaleno sulfonato de antelvencina es un sólido cristalino blanco que funde a aproximadamente 181-183°C, soluble en agua caliente, metanol, alcohol ben-  
cilico, dimitelformamida, dimetil sulfóxido, fenol, metil  
celosolve y mezclas disolventes acuosos tales como aceto-  
na acuosa, alcohol acuoso y similares. Es solo ligeramente  
soluble en etanol, y relativamente insoluble en disolven-  
tes tales como agua fría, isopropanol, acetona, acetato  
de etilo, eter, cloroformo, benceno, y similares.

La valoración electrométrica de 2-naftaleno sulfonato de antelvencina en dimetilformamida acuosa al 66% indica la presencia de dos grupos valorables que tienen índices de pK'a de 9,58 y 11,95. El peso molecular aparente determinado a partir de la curva de valoración es aproximadamente de 847.

Un promedio de varios microanálisis de 2-naftalenosulfonato de antelvencina indica la siguiente composición en porcentaje aproximada: C, 54,78%; H, 5,23%; N 14,66%; O, 17,38%; S, 7,41%. La fórmula empírica de la sal que cumplimenta mejor estos datos es  $C_{39}H_{44}N_9O_9S_2$ , a partir de la cual la fórmula empírica de la base libre de antelvencina se calcula que es  $C_{19}H_{28}N_9O_3$ .

El espectro de absorción de radiaciones infrarrojas de 2-naftaleno sulfonato de antelvencina en una mezcla amasada de aceite mineral se muestra en la figura 1. Las bandas perceptibles en la curva de absorción de radiaciones infrarrojas sobre el margen de 2,0 a 15,0 micrones son las siguiente: 2,79, 3,04, 3,20, 3,41 (aceite mineral), 3,48 (aceite mineral), 5,86, 5,91 (saliente), 6,08, 6,26, 6,47, 6,60 (saliente), 6,83 (aceite mineral), 6,95, 7,07,

311094



7,22 (mayormente aceite mineral), 7,40, 7,55, 7,88, aproximadamente 8,35 (ancha), 8,55, 8,65, 8,79, 9,11, 9,36, 9,64, 10,10 (débil), 10,30, 10,49 (débil), 10,58, 10,95, 11,11, 11,25, 11,52, 12,16, 12,39, 12,98, 13,17, 13,38, 13,89, y 14,78 micrones.

La rotación específica de 2-naftaleno sulfonato de antelvencina, secado a la temperatura ambiente en un desecador en vacío sobre pentóxido de fósforo, es +11,7° determinada a una temperatura de 25°C en una solución de etanol acuoso al 95% en que la concentración de la sal antibiótica es del 1% sobre una base de peso por volumen.

El espectro de absorción de radiaciones ultravioletas de una solución acuosa de 2-naftaleno sulfonato de antelvencina muestra un máximo a 225 milimicras con una absorptividad de  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2.180$ , y otro máximo a 285 milimicras con una absorptividad de  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 330$ .

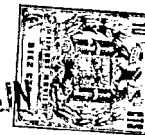
Una curva de difracción de Rayos X de polvo de esta sal, utilizando radiación de cobre filtrado con níquel y un valor de longitud de onda de 1,5405 Å para caracterizar las separaciones interplanarias, da los siguientes valores:

(d)	( $I/I_1$ )
11,70	0,10
10,71	0,02
9,50	0,10
8,33	0,33
8,00	0,02
7,40	0,02
7,07	0,10
6,70	0,04

3 1 1 0 9 4



	(a)	(I/I <sub>1</sub> )
	6,25	0,20
	6,06	0,50
	5,86	0,27
5	5,56	0,07
	5,23	0,20
	4,95	0,02
	4,63	1,00
	4,36	0,13
10	4,15	0,07
	3,99	0,13
	3,79	0,04
	3,65	0,50
	3,45	0,27
15	3,33	0,01
	3,28	0,10
	3,11	0,33
	3,00	0,10
	2,90	0,03
20	2,82	0,02
	2,68	0,07
	2,59	0,07
	2,47	0,07
	2,46	0,01
25	2,39	0,03
	2,34	0,02
	2,27	0,02
	2,24	0,02
	2,18	0,02
30	2,09	0,04



	(a)	( $I/I_1$ )
	2,01	0,04
	1,977	0,04
	1,870	0,02
5	1,809	0,03
	1,747	0,03
	1,717	0,01
	1,657	0,02
	1,552	0,02

10

El 2-naftaleno sulfonato de antelvencina da un resultado positivo en el ensayo de EHRLICH y resultados negativos en el ensayo con ninhidrina para alfa-aminoácidos y en el ensayo de SAKAGUCHI para grupos de guanidina.

15

La sal de ácido salicílico de antelvencina es un sólido cristalino blanco que funde a aproximadamente 153-155°C. Las características de solubilidad de esta sal son similares a las del 2-naftalenosulfonato, excepto en una solubilidad ligeramente aumentada en agua fría.

20

La valoración electrométrica de salicilato de antelvencina en dimetilformamida acuosa al 66% indica la presencia de dos grupos valorables con valores pK'a de 9,75 y 11,98 y un peso molecular aparente de aproximadamente 726. El espectro de absorción de radiaciones infrarrojas del salicilato de antelvencina, mostrado en la figura 2, tiene las bandas perceptibles sobre el margen de 2,0 a 15,0 micrones siguientes: 3,05, 3,42 (aceite mineral), 3,48 (aceite mineral) 3,65 (saliente), 3,73 (saliente), 4,00, 4,25 (débil), 5,88, 6,10, 6,26, aproximadamente 6,50 (ancho) 6,73, 6,85 (aceite mineral), 7,24, 7,40,

25

30

3 1 1 0 9 4



7,69, 8,00, 8,15 (saliente), 8,31, 8,68 (saliente) 8,76, 8,92, 9,40 (débil), 9,72, 10,43 (débil), 11,27 (débil) 11,66, 12,44, 13,22, 13,90, 14,27 y aproximadamente 15,10 micrones.

5 Una solución acuosa de salicilato de antelvencina, muestra dos máximos en su espectro de absorción de radiaciones ultravioleta, uno a 230 milimicras con una absortividad de  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 508$ , y el otro a 295 milimicras con una absortividad de  $E_{1\text{ cm}}^{1,5} = 435$ .

10 Análisis elementales de salicilato de antelvencina indican que la sal tiene la siguiente composición en porcentaje aproximada: C, 56,27%; H 5,62%; N, 17,97%; O, 20,09%.

15 La fórmula empírica calculada para la sal es  $C_{33}H_{40}N_9O_9$ , que indica también una fórmula para la base libre de antelvencina de  $C_{19}H_{28}N_9O_3$ .

El salicilato de antelvencina tiene una rotación específica de  $+7,9^\circ$  determinada a  $25^\circ\text{C}$  sobre una solución al 1% de la sal en etanol acuoso al 95%.

20 Se pueden utilizar otros ácidos, orgánicos e inorgánicos, para preparar sales de adición de antelvencina. Ácidos inorgánicos que se pueden emplear incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares. Como ejemplos de ácidos orgánicos que se pueden  
25 emplear para la formación de sal pueden ser mencionados: ácido cítrico, ácido fórmico, ácido acético, ácido tartárico, ácido p-bromosalicilico, ácido picrico, ácido m-nitrobenzoico, ácido flavianico, ácido p-nitroftalico, ácido p-(2-hidroxil-naftil-azo)bencenosulfónico (Orange II), y  
30 ácidos similares. En general, las sales de adición de an-

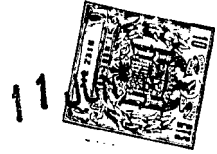


antelvencina con ácidos orgánicos se preparan preferiblemente a partir de una sal de ácido inorgánico, tal como por ejemplo el clorhidrato.

5 La fórmula estructural completa de antelvencina no ha sido determinada todavía. Sin embargo, los estudios de degradación hidrolítica, indican que la antelvencina contiene uno o más radicales de pirrol y una pluralidad de enlaces peptidos. Los estudios de degradación muestran también que la molécula de antelvencina contiene una o  
10 más unidades de beta-alanina, y ácido glutámico o un fragmento que es convertido en ácido glutámico bajo las condiciones de degradación. Tal como es frecuentemente el caso con antibióticos peptidos, la antelvencina, tal como se obtiene normalmente desde el fermentador, comprende al me  
15 nos dos compuestos íntimamente relacionados que a partir de ahora serán citados como antelvencina A y antelvencina B. El término antelvencina, tal como se emplea aquí, se refiere al antibiótico que se obtiene a partir de la fermentación.

20 Las propiedades físicas de antelvencina A y antelvencina B son muy similares. Los antibióticos se distinguen principalmente por su comportamiento en determinados sistemas cromatográficos. Un método especialmente útil para distinguir los antibióticos comprende la utilización de cromatografía en capa delgada sobre gel de silice con un sistema disolvente compuesto por 15 partes de  
25 n-butanol, 10 partes de piridina, una parte de ácido acético glacial, y 12 partes de agua. En tal sistema, el valor  $R_f$  para antelvencina A resulta ser de 0,5, mientras que el antelvencina B es de 0,3.  
30

3 1 1 0 9 4



La antelvencina tiene una acción inhibitoria con  
tra el crecimiento de determinados organismos microbianos,  
incluyendo patogenos de plantas bacterianos y hongos. Cua  
litativamente, las actividades microbiológicas de antel-  
5 vencina A y antelvencina B son virtualmente idénticas.  
Sin embargo, sobre una base de igual peso, el potencial  
microbiológico de naftalenosulfonato de antelvencina A re-  
sulta ser aproximadamente el doble del de la sal corres-  
pondiente de antelvencina B. Las dosis de antelvencina que  
10 muestran inhibición contra el crecimiento de organismos  
ilustrativos, se indican numéricamente en la tabla I. Las  
dosis inhibitorias se determinaron por el ensayo de dilu-  
ción en agar, o por el ensayo de dilución en caldo. Las  
concentraciones inhibitorias para los patogenos de planta  
15 bacterianos y hongos se determinaron durante un período de  
72 horas.

En el ensayo de dilución en agar, el organismo  
de ensayo es extendido o implantado sobre una serie de  
placas de agar que contienen diversas concentraciones de  
20 antelvencina en el agar para determinar la concentración  
mínima del antibiótico en mcg/ml (microgramos por milili-  
tro) que inhibe el crecimiento del organismo durante un  
período de 48 horas.

En el ensayo de dilución en caldo, una serie de  
25 tubos que contienen caldo nutriente con diversas concen-  
traciones en antelvencina, son inoculados con el organis-  
mo de ensayo para determinar la concentración mínima de  
antelvencina en mcg/ml. en el substrato de caldo que inhi  
be el crecimiento del organismo durante un período de 24  
30 horas.

311094

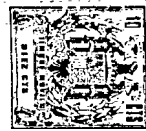


TABLA I

	<u>Organismo de ensayo</u>	<u>Concentración mínima inhibi- toria mcg/ml. 24 horas</u>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25,00
	<i>Staphylococcus albus</i>	50,00
5	<i>Bacillus subtilis</i>	12,50
	<i>Sarcina lutea</i>	1,56
	<i>Myc. tuberculosis (607)</i>	50,00
	<i>Myc. avium</i>	25,00
	<i>Escherichia coli</i>	12,50
10	<i>Proteus vulgaris</i>	25,00
	<i>Aerobacter aerogenes</i>	100,00
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25,00
	<i>Salmonella enteritidis</i>	50,00
	<i>Shigella paradysenteriae</i>	50,00
15	<i>Vibrio metschnikovii</i>	50,00
	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	6,25
	<i>Candida albicans</i>	100,00
	<i>Trichophyton rubrum</i>	3,13 <sup>a</sup>
	<i>Trichophyton interdigitale</i>	3,13 <sup>a</sup>
20	<i>Argobacterium tumefaciens</i>	12,50
	<i>Corynebacterium michiganense</i>	1,56
	<i>Erwinia amylovora</i>	6,25
	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	6,25
	<i>Xanthomonas phaseoli</i>	12,50
25	<i>Alternaria solani</i>	6,25
	<i>Botrytis cinerea</i>	6,25
	<i>Caratostomella ulmi</i>	25,00
	<i>Colletotrichum pisi</i>	12,50
	<i>Endoconidiophora fagacearum</i>	50,00
30	<i>Fusarium moniliforme</i>	50,00



TABLA I (Continuación)

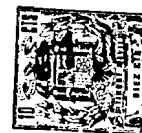
<u>Organismo de ensayo</u>	<u>Concentración mínima inhibitoria mcg/ml. 24 horas</u>
Glomerella cingulata	25,00
5 Helminthosporium sativum	12,50
Penicillium expansum	50,00
Phoma pigmentovora	100,00
Polyporus ostreatus	3,13
Pullularia sp.	100,00
10 Verticillium albo-atrum	50,00

(a) Determinada durante 48 horas.

Se obtienen valores idénticos con la sal de salicilato de antelvencina. Resulta evidente a partir de estos datos que la antelvencina en forma de sus sales de adición de ácido, es útil para suprimir el crecimiento de una diversidad de organismos patógenos.

Las sales de adición de ácido de antelvencina son también útiles para el control de helmintos y otros diversos tipos de organismos parásitos. Así, por ejemplo, se ha demostrado la actividad frente a ambas especies de oxiuros de ratón, "Syphacia obvelata" y "Aspicularis tetraoptera" y frente a los helmintos de cerdo, "Ascaris summa", "Oosphagostomum spp." y "Trichuris suis". Cuando se incluyen en la ración alimenticia diaria de cerdos durante al menos 35 días, las sales de antelvencina, a una dosis tan pequeña como 12 g. por tonelada de alimento, son efectivas para reducir la carga de gusanos de los animales. Se pueden emplear también combinaciones de antelvencina con otras sustancias con actividad antihelmíntica,

311094



tales como por ejemplo piperazina, higromicina B y similares. Otros organismos que son controlados por la antelvencina incluyen "Escherichia coli", "Proteus vulgaris", "Entamoeba Hystolytica", y similares.

5 La toxicidad aguda del salicilato de antelvencina ha sido determinada en ratones. Oralmente, el LD<sub>50</sub> de esta sal es mayor que 500 mg/kg. El LD<sub>50</sub> del salicilato de antelvencina es aproximadamente 175 mg/kg cuando la droga es administrada por inyección intraperitoneal.

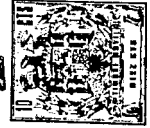
10 La antelvencina puede ser producida cultivando cepas hasta ahora desconocidas de "Streptomyces venezuelae" bajo condiciones aerobias en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas. Los organismos fueron aislados primeramente  
15 a partir de muestras de tierra. Las porciones de las muestras de tierra fueron suspendidas en agua destilada estéril y las suspensiones fueron rayadas sobre placas de agar nutriente. Las placas de agar nutriente sembradas fueron incubadas a aproximadamente 25-35°C durante varios  
20 días. Al final del tiempo de incubación, colonias de los organismos productores de antelvencina fueron trasladadas por medio de una anilla de platino estéril a cultivos inclinados de agar. Los cultivos inclinados de agar inoculados fueron incubados para proporcionar mayores cantidades  
25 de inóculo para la producción de antelvencina.

Los nuevos organismos capaces de producir antelvencina han sido colocados bajo depósito permanente en la American Type Culture Collection en Washington, D.C., USA, y están disponibles al público bajo los números de registro ATCC 14.583, 14.584 y 14.585.  
30



A causa de la inseguridad de los estudios taxonómicos con el grupo de organismos Streptomyces, existe siempre un elemento de duda asociado con la clasificación de un organismo recientemente descubierto. Sin embargo, los organismos que producen la antelvencina parecen seme-  
5 jarse mucho en las características más importantes a las descripciones publicadas de los organismos "S. cinnamomeus", "S. roseoflavus", y "S. venezuelae" (NRRL 902), todos los cuales se parecen a determinadas cepas de "S. lavendulae" con cadenas rectas de esporas. A pesar de algu-  
10 nas similitudes, sin embargo, existen suficientes diferencias para distinguir los nuevos organismos empleados en este invento de todos los organismos anteriormente descritos. Los organismos actualmente empleados se supone que son más próximos en sus características al "S. venezuelae"  
15 (NRRL 902) anterior que a cualquier otro organismo anteriormente descrito. Sin embargo, existen algunas diferencias entre los presentes cultivos y el "S. venezuelae" (NRRL 902). Por ésto los actuales nuevos organismos son designados como nuevas cepas de "S. venezuelae".  
20

La descripción detallada aquí contenida se hará con referencia particular a los organismos recientemente encontrados ATCC 14.583, 14.584 y 14.585. Sin embargo, se ha de sobreentender que la producción de antelvencina por  
25 crecimiento de mutantes de éstos organismos productores de antelvencina cae dentro del alcance de este invento. Tales otros mutantes pueden ser producidos por medio de procedimientos conocidos, por ejemplo sometiendo a una de las anteriores cepas a radiación de Rayos X o ultravioleta  
30 o a agentes químicos, tales como por ejemplo mostazas ni-



311097

trogenadas.

5 Los métodos empleados en los estudios taxonómicos de las cepas productoras de antelvincina de "S. venezuelae" ATCC 14.583, 14.584 y 14.585 son los comunmente utilizados en la taxonomía de actinomicetos. Los ensayos de utilización de carbono se llevaron a cabo de acuerdo con el método descrito por Pridham y Gottlieb, J. Bact. 56, 107 (1948). Los datos obtenidos a partir de los estudios taxonómicos se muestran más abajo en forma tabular.

10 Los números entre parentesis se refieren a bloques de color en Maers y Paul "Dictionary of Color" (1950). Los cultivos fueron desarrollados a 30°C. Las características morfológicas, fisiológicas y de cultivo fueron determinadas después de 14 días de incubación. La utilización de

15 carbono se observó después de 10 días de incubación.



311094

TABLA II

DESCRIPCIONES DE LOS CULTIVOS ATCC 14.583, 14.584, 14.585

Propiedad comparada	ATCC 14.583	ATCC 14.584	ATCC 14.585
Morfología	Cadenas de esporas rectas o tortuosas; esporas 0,7-1,0 micras por 1,0-1,8 micras, ovales a cilíndricas	Cadenas de esporas rectas o tortuosas; esporas 0,7-1,0 micras por 1,0-1,8 micras ovales a cilíndricas	Cadenas de esporas rectas o tortuosas; esporas 0,7-1,0 micras por 1,2-1,8 micras, cilíndricas
Características de colonia sobre: pasta de tomate; harina de avena	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante; rosa-gris (43-1B); reverso rojo-marrón (16-11A); sin pigmento soluble	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante; gris claro (35-41); reverso marrón (15-27); sin pigmento soluble	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante; rosa-gris (51-2A); reverso rojo-oscuro-marrón (8-9H); pigmento soluble rojo oscuro-marrón
Agar nutriente	Crecimiento regular; sin micelio aéreo; reverso amarillo (10-1E); sin pigmento soluble	Crecimiento regular; sin micelio aéreo; reverso amarillo (11-17); sin pigmento soluble	Crecimiento regular; sin micelio aéreo; reverso amarillo (10-3H); sin pigmento soluble
Levadura	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante; gris claro (20-1A); reverso rojo claro-marrón; sin pigmento soluble	Crecimiento moderado; micelio aéreo moderado, blanco a marrón claro (4-48); reverso marrón (14-38); sin pigmento soluble	Crecimiento abundante; micelio aéreo esparcido, blanco (1-1B); reverso rojo-marrón; sin pigmento soluble
Agar de sales-almidón	Crecimiento abundante; micelio aéreo, gris-blanco (12-1A); reverso marrón (14-11G); sin pigmento soluble	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante; blanco a marrón claro (10-42); reverso marrón (14-45); sin pigmento soluble	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante; naranja claro-a marfillo (9-2A); reverso marrón (8-10J); marrón muy claro pigmento soluble
Agar de Czapek	Crecimiento moderado; micelio aéreo moderado, casi blanco (2-7A); reverso amarillo (11-4J); sin pigmento soluble	Crecimiento moderado; micelio aéreo moderado, blanco a marrón claro (3-B7, 3A8); reverso rojo-marrón (7-H9); ligero pigmento soluble rojo.	Crecimiento moderado; micelio aéreo moderado, blanco; reverso rojo-marrón (5-9G); sin pigmento soluble.
Acción sobre la leche	Coagulación, peptonización	Coagulación, peptonización	Coagulación, peptonización
Gelatina nutriente	Licuefacción completa después de 19 días	50% de licuefacción después de 19 días	Licuefacción completa después de 19 días
Reducción de nitrato	+	+	+
Producción de SH <sub>2</sub>	-	-	-

3-1004

TABLA II

DESCRIPCIONES DE LOS CULTIVOS A1

<u>Propiedad comparada</u>	<u>ATCC 14.583</u>
Morfología	Cadenas de esporas rectas o tortuosas; esporas 0,7-1,0 micras por 1,0-1,8 micras, ovales a cilíndricas
Características de colonia sobre: pasta de tomate- harina de avena	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante, rosa-gris (43-1B); reverso rojo-marrón (16-11A); sin pigmento soluble
Agar nutriente	Crecimiento regular; sin micelio aéreo; reverso amarillo (10-1E); sin pigmento soluble
Levadura	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante; gris claro (20-1A); reverso rojo claro-marrón; sin pigmento
Agar de sales- almidón	Crecimiento abundante; micelio aéreo, gris-blanco (12-1A); reverso marrón (14-11G); sin pigmento soluble
Agar de Czapek	Crecimiento moderado; micelio aéreo moderado, casi blanco (2-7A); reverso amarillo (11-4J); sin pigmento soluble
Acción sobre la leche	Coagulación, peptonización
Gelatina nutriente	Licuefacción completa después de 19 días
Reducción de nitrato	+
Producción de SH <sub>2</sub>	-



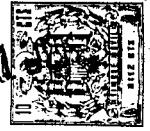
311094

II

VCS ATCC 14.583, 14.584, 14.585

	<u>ATCC 14.584</u>	<u>ATCC 14.585</u>
uo- icas	Cadenas de esporas rectas o tortuosas; esporas 0,7-1,0 micras por 1,0-1,8 micras ovales a cilíndricas	Cadenas de esporas rectas tortuosas; esporas 0,7-1,0 micras por 1,2-1,8 micras, cilíndricas
ereo ver- men-	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante, gris claro (35-A1); reverso marrón (15-E7); sin pigmento soluble	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante, rosa-gris (51-2A); reverso rojo-oscuro-marrón (8-9H); pigmento soluble rojo oscuro-marrón
	Crecimiento regular; sin micelio aéreo; reverso amarillo (11-E7); sin pigmento soluble	Crecimiento regular; sin micelio aéreo; reverso amarillo (10-3H); sin pigmento soluble
éreo ever to	Crecimiento moderado; micelio aéreo moderado, blanco a marrón claro (4-A8); reverso marrón (14-J8); sin pigmento soluble	Crecimiento abundante; micelio aéreo esparcido, blanco (1-1E); reverso rojo-marrón; sin pigmento soluble
éreo, rón	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante; blanco a marrón claro (10-A2); reverso marrón (14-A5); sin pigmento soluble	Crecimiento abundante; micelio aéreo abundante, naranja claro-a marillo (9-2A); reverso marrón (8-10J); marrón muy claro pigmento soluble
ereo ver to	Crecimiento moderado; micelio aéreo moderado, blanco a marrón claro (3-B7, 3A8); reverso rojo-marrón (7-H9); ligero pigmento soluble rojo.	Crecimiento moderado; micelio aéreo moderado, blanco; reverso rojo-marrón (5-9G); sin pigmento soluble.
	Crecimiento superficial amarillo parduzco abundante, coagulación peptonización parcial.	Coagulación, peptonización
	50% de licuación después de 19 días	Licuación completa después de 19 días
	+	+
	-	-

311094



En la tabla III se indican los resultados de los ensayos de utilización de carbono desarrollados sobre organismos ATCC 14.583, 14.584 y 14.585. En la tabla se emplean los siguientes símbolos:

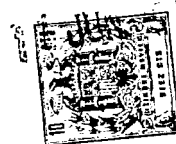
- 5            + = crecimiento y utilización  
              - = sin crecimiento o utilización aparentes

TABLA III

10            Cuadro de utilización de carbono para organismos productores de antelvecina.

	Substrato	respuesta de crecimiento		
		ATCC 14583	ATCC 14584	ATCC 14585
	L (+)-Arabinosa	+	+	+
	L (+)-Ramosa	-	-	-
15	D-Ribosa	+	+	+
	D (+)-Xilosa	+	+	-
	Dextrosa	+	+	+
	D (-)-Fructosa	+	+	+
	Manosa	+	+	+
20	Lactosa	-	-	-
	Maltosa	+	+	+
	Sacarosa	-	-	-
	D (+)-Trehalosa	+	+	+
	Inulina	-	-	-
25	D (+)-Rafinosa	+	+	+
	i-Inositol	+	-	+
	Manitol	+	+	+
	Sorbitol	-	-	-
	Celulosa	-	-	-
30	Salicina	+	+	+

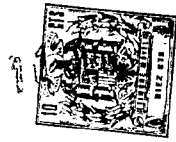
311094



El medio de cultivo utilizable para producir antelvincina por cultivo de los organismos anteriormente descritos puede ser uno cualquiera de varios medios ya que, tal como es evidente de los ensayos de utilización anteriormente descritos, el organismo es capaz de utilizar diferentes fuentes de energía. Sin embargo, por razones de economía de producción, de máximo rendimiento en antibiótico, y de facilidad de aislamiento del antibiótico, son preferibles determinados medios de cultivo que contienen fuentes nutrientes relativamente simples. Por ejemplo, los medios que son útiles para la producción de antelvincina, incluyen una fuente asimilable de carbono tal como glucosa, fructosa, maltosa, manosa, almidón soluble, melaza, dextrina, azúcar morena, sólidos de maceración de maíz y similares. Una fuente preferida de carbono es la glucosa. Adicionalmente, los medios utilizables incluyen una fuente de nitrógeno asimilable tal como harina de avena, extracto de carne, peptonas (carne o soja), caseína hidrolizada, levadura, mezclas de aminoácidos, y similares. Fuentes actualmente preferidas de nitrógeno son las peptonas, caseína hidrolizada y extractos de carne.

Salos minerales, por ejemplo las que proporcionan iones calcio, magnesio, sodio, potasio, cloruro, sulfato y carbonato, y una fuente de factores de crecimiento, tal como levadura o extracto de levadura, pueden ser incorporadas en los medios con resultados beneficiosos.

Igual que con muchos microorganismos, se supone deseable incluir los denominados "elementos traza" en el medio de cultivo para cultivar los actinomicetos empleados en este invento. Tales elementos traza son suministrados



dos comúnmente como impurezas acompañando a la adición de los otros constituyentes del medio,

5 El pH inicial del medio de cultivo puede variar extensamente. Sin embargo, se ha encontrado deseable que el pH inicial del medio esté entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,5, y preferiblemente entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,3. Tal como se ha observado con otros actinomicetos, el pH del medio aumenta gradualmente a lo largo del período de crecimiento del organismo, mientras se está produciendo antelvincina, y puede alcanzar un valor entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0 o superior, siendo dependiente el pH final, al menos en parte, del pH inicial del medio, de las soluciones tampones presentes en el medio, y del período de tiempo en que se deja crecer al organismo.

10

15

Las condiciones de cultivo aerobio sumergido son las condiciones de elección para la producción de antelvincina. Para la preparación de cantidades relativamente pequeñas se pueden emplear frascos agitadores y cultivo superficial en botellas; pero para la preparación de grandes cantidades, se prefiere el cultivo aerobio sumergido en tanques estériles. El medio del tanque estéril puede ser inoculado con una suspensión esporulada; pero a causa del retraso en el crecimiento experimentado cuando se utiliza como inóculo una suspensión esporulada, se prefiere la forma vegetativa del cultivo. Evitando de esta manera el retraso en el crecimiento, se consigue una utilización más eficaz del equipo de fermentación. Correspondientemente, es deseable producir primeramente un inóculo vegetativo del organismo, inoculando una cantidad relativamente

20

25

30

311094



pequeña de medio de cultivo con la forma de espora del organismo; y cuando se ha obtenido un inóculo vegetativo activo y joven, trasladar el inóculo vegetativo de forma aseptica al gran tanque. El medio en el que se produce el inóculo vegetativo puede ser igual o diferente que el medio utilizado para la producción a gran escala de antelvincina.

Los organismos crecen mejor a temperaturas dentro del margen de aproximadamente 26°C a aproximadamente 33°C. La producción óptima de antelvincina parece tener lugar a temperaturas de aproximadamente 26-30°C.

Tal como es habitual en los procesos de cultivo sumergido aerobio, se insufla aire esteril a través del medio de cultivo. Para un eficaz crecimiento del organismo y producción de antelvincina, el volumen de aire empleado en la producción en tanque de antelvincina está preferiblemente por encima de 0,1 volúmenes de aire por minuto y por volumen de medio de cultivo. Se obtiene un crecimiento eficaz y rendimientos óptimos en antelvincina cuando el volumen de aire utilizado es al menos de un volumen de aire por minuto y por volumen de medio de cultivo.

La concentración de la actividad de antelvincina en el medio de cultivo puede ser seguida fácilmente durante el período de fermentación ensayando muestras del medio de cultivo en cuanto a su actividad inhibitoria frente al crecimiento de un organismo que se sepa que se inhibe en presencia de antelvincina. La utilización del organismo "Bacillus subtilis" ha resultado ser apropiada para este fin. El ensayo se puede desarrollar por métodos turbidimétricos o de cubeta-placa.

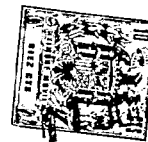


En general, la máxima producción del antibiótico se verifica dentro de aproximadamente 4 y 7 días después de la inoculación del medio de cultivo cuando se emplea un cultivo aerobio sumergido o un cultivo de frasco agitador, y dentro de aproximadamente 5 a 10 días cuando se desarrolla un cultivo superficial.

El micelio y los sólidos no disueltos son separados del caldo de fermentación por medios convencionales tales como filtración o centrifugación, usualmente después de ajuste del pH a un valor de aproximadamente 3,5. La actividad antibiótica está contenida en el caldo filtrado y puede ser separada de éste empleando las técnicas usuales de adsorción. Se pueden emplear una variedad de adsorbentes pero se prefieren generalmente las resinas de intercambio de iones de carácter ácido. Una resina especialmente preferida es IRC-50, una resina de ácido carboxílico débilmente catiónica vendida por la Rohm and Haas Company.

Al emplear la técnica de adsorción en columna, la antelvincina se puede recuperar haciendo pasar el filtrado de caldo sobre una columna rellena con una resina de intercambio de iones apropiada, por ejemplo IRC-50. Habitualmente, si se emplea una parte de resina por cada 30 a 35 partes de filtrado de caldo, se logra una separación sustancialmente completa de antelvincina desde el caldo, cuando la velocidad de circulación a través de una columna con un diámetro de 75 mm., se mantiene entre aproximadamente 5 y 10 ml. por minuto. Subsiguientemente, la columna es lavada a fondo con agua hasta que el efluente es incoloro, y la actividad antibiótica es eluida desde la columna empleando una mezcla disolvente que comprende un

311094



5 ácido diluido acuoso y un disolvente orgánico miscible con agua. Así, por ejemplo, una mezcla disolvente que comprende 80 partes en volumen de ácido clorhídrico 0,5N y 20 partes en volumen de acetona, ha resultado ser altamente efectiva para eluir la actividad de antelvencina.

10 Para llevar a cabo la separación de algunas impurezas asociadas, el pH del eluato es ajustado a aproximadamente un pH 5,5 con una base, el eluato es concentrado a aproximadamente 3/4 de su volumen original, se añaden, con agitación al eluato concentrado, aproximadamente 3 volu-  
15 men de acetona, y el pH de la mezcla resultante se ajusta de nuevo a aproximadamente un pH 6,5. Seguidamente la mezcla es hecha pasar a través de una columna rellena con Florisil de 149-250 micras (un adsorbente de silicato de magnesio vendido por la Floridin Company) para separar los pigmentos y alquitranes. La columna es lavada con acetona acuosa al 75% hasta que el efluente es negativo al reacti-  
20 vo de Ehrlich, y el efluente original y el producto lavado son combinados y concentrados. Se añade cloruro de sodio al concentrado en la proporción de aproximadamente 250 g. de cloruro de sodio por litro de concentrado. El residuo aceitoso oscuro que se separa es apartado, la mezcla es filtrada, y el filtrado transparente es extraído con alcohol bencílico. El agua es separada de los extractos en al-  
25 cokol bencílico "in vacuo" y la solución en alcohol bencílico seca resultante es añadida lentamente a aproximadamente 9 volúmenes de acetona. El enfriamiento brusco de la mezcla resultante realiza la precipitación del clorhidrato de antelvencina. El producto así obtenido consiste princi-  
30 palmente en el clorhidrato de antelvencina A, con una can-



cantidad más pequeña de clorhidrato de antelvencina B.

Se puede preparar antelvencina A exenta de antelvencina B en forma de una de sus sales de adición de ácido por nuevo tratamiento de la preparación obtenida tal como se describe anteriormente. Así, por ejemplo, la mezcla de clorhidratos de antelvencina puede ser disuelta en un sistema disolvente que comprende n-butanol, piridina, ácido acético, y agua, y la solución así obtenida puede ser hecha pasar a través de una columna rellena con polvo de celulosa previamente tratada. El polvo de celulosa es suspendido en agua para preparar una suspensión, y es sometido subsiguientemente a filtración y sucesiva re-suspensión en ácido clorhídrico acuoso 0,2 N, agua y un sistema disolvente que comprende n-butanol, piridina, ácido acético y agua en la proporción de 15:10:1:12. El eluato que sale de la columna es recogido a intervalos regulares y el curso del fraccionamiento cromatográfico es vigilado examinando las fracciones con ayuda de cromatografía en capa delgada. Las primeras fracciones recogidas contienen solo clorhidrato de antelvencina A. Estas son seguidas por fracciones intermedias que contienen las sales de ambos factores. El clorhidrato de antelvencina B puro aparece en las fracciones finales recogidas. Las fracciones que contienen los factores individuales solos son reunidas y concentradas hasta sequedad para obtener una preparación pura del clorhidrato de antelvencina A ó B, según se el caso.

Se pueden emplear sales distintas que el clorhidrato para separar la mezcla antelvencina A y B en sus componentes individuales. Así por ejemplo, la mezcla de

311094



clorhidratos puede ser convertida en una mezcla que contiene las sales de naftalenosulfonato o de salicilato, que pueden ser sometidas seguidamente a un fraccionamiento cromatográfico similar para aislar la sal correspondiente de antelvencina A exenta de la sal de antelvencina B.

Ejemplo 1: Preparación de antelvencina.

Un cultivo de "Streptomyces venezuelae" ATCC 14.584 se produce cultivando el organismo sobre un cultivo inclinado de agar nutriente. El agar nutriente se prepara a partir de 65 g. de harina de avena cocida como una suspensión, se tamiza y mezcla con 20 g. de agar y suficiente agua para producir el volumen total de un litro. El plano inclinado es inoculado con esporas de "S. venezuelae" ATCC 14.584, y es incubado durante 5 días a 30°C. El producto del cultivo sobre el cultivo inclinado es cubierto con aproximadamente 5 ml. de agua destilada, y el cultivo inclinado es rascado suavemente para separar los organismos y crear una suspensión acuosa de éstos.

Un mililitro de la suspensión así obtenida, es utilizado para inocular bajo condiciones asepticas una porción de 100 ml. de un medio de cultivo vegetativo esteril con la siguiente composición:

	Cerclose	15 g.
25	Harina de soja	15 g.
	Sólidos de maceración de maiz	5 g.
	Cloruro de sodio	5 g.
	Carbonato de calcio	2 g.
30	Agua suficiente para producir un volumen final de	1 l.



El medio vegetativo inoculado es incubado a aproximadamente 30°C durante 48 horas, durante cuyo tiempo los frascos son agitados a la velocidad de 108 ciclos por minuto sobre un agitador alternativo con una carrera de 50 mm.

Cinco mililitros del inóculo vegetativo se utilizan para inocular asepticamente porciones de 100 ml. de un medio de producción contenido en matraces Erlenmeyer de 500 ml., habiendo sido esterilizado el medio a 120°C durante 30 minutos y teniendo la siguiente composición:

	Harina de soja	15 g.
	Caseína	1 g.
	Nitrato de sodio	3 g.
	Jarabe de glucosa bruto	20 ml.
15	Carbonato de calcio	2,5 g.
	Agua suficiente para producir un volumen final de	1 l.

El cultivo inoculado es incubado durante 5 días a aproximadamente 30°C con agitación sobre un agitador alternativo tal como se describe anteriormente. El pH del medio de partida es aproximadamente de 6,9. Al final del período de incubación, el pH del medio ha aumentado a aproximadamente 7,3.

El caldo de cultivo así obtenido es filtrado para separar el micelio y los sólidos no disueltos. El caldo filtrado contiene la antelvencina que es producida por los organismos.

Ejemplo 2: Preparación de clorhidrato de antelvencina.

311094

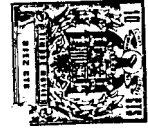


5 Un cultivo de "Streptomyces venezuelae" ATCC 14.584, es producido tal como se describe en el ejemplo 1 utilizando un medio nutriente que comprende 20 g. de almidón, 3 g. de extracto de carne, 1 g. de asparagina, 20 g. de agar y agua suficiente para producir un volumen total de un litro. Los cultivos inclinados son cultivados durante 5 a 7 días a una temperatura de aproximadamente 30°C.

10 El cultivo inclinado es cosechado seguidamente tal como se describe en el ejemplo 1, y 1 ml. de la suspensión así obtenida es empleado para inocular asepticamente un matraz Erlenmeyer de 500 ml. que contiene 100 ml. de un medio de cultivo vegetativo esterilizado con la siguiente composición:

15	Dextrosa, técnica	15 g.
	Harina de soja, extraída con disolvente	15 g.
	Líquido de maceración de maíz	10 g.
	Cloruro de sodio	5 g.
20	Carbonato de calcio	2 g.
	Agua, suficiente para producir un volumen final de	1 litro

25 El medio inoculado es incubado durante 24 horas a 30°C con agitación a 250 ciclos por minuto sobre un agitador rotativo con una carrera de 50 ml. Aproximadamente 25 ml. del cultivo vegetativo resultante son trasladados seguidamente por medio de una pipeta esteril a un matraz Erlenmeyer modificado de 4 litros que contiene 1 litro de un medio con la misma composición. La incubación se lleva  
30 a cabo durante 48 horas bajo las condiciones que se aca-



ban de describir. Todo el contenido del matraz que contiene el cultivo vegetativo es trasladado a un fermentador de acero inoxidable de 45 litros provisto totalmente de placas de desviación de corriente, equipado con 2 impulsores de 6 palas de 125 mm. de diámetro, y que contiene 28 litros de un medio de producción con una composición tal como la siguiente.

	Dextrosa, técnica	30 g.
10	Harina de soja, extraída con disolvente	20 g.
	Nitrato de sodio	3 g.
	Carbonato de calcio	5 g.
	Aceite de semillas de algodón	2 ml.
	Caseína	2 g.
15	Agua, suficiente para producir	1 litro

La fermentación se lleva a cabo a 30°C durante 4 días con agitación a una velocidad de 400-450 rpm. La formación de espuma se reprime por la adición, cuando es necesario, de aceite de soja. En el transcurso de la fermentación, el medio es aireado por adición de aire estéril a la velocidad de aproximadamente 30 litros por minuto. Al final del período de fermentación, todo el caldo es ajustado a aproximadamente un pH 3,5 con ácido sulfúrico 5N, y se añade aproximadamente 3% (peso/volumen) de un coadyuvante de filtración comercial. Después de la filtración se obtienen aproximadamente 22 litros de caldo filtrado.

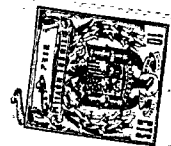
Los caldos combinados de 4 fermentaciones en tanques son hechos pasar sobre una columna rellena, de 75 mm. de diámetro, que contiene aproximadamente 2.650 ml.

3 1 1 0 9 4



de resina húmeda IRC-50 en el ciclo ácido. Cuando la velocidad de circulación es ajustada a aproximadamente 6 ml. por minuto, el efluente que sale de la columna no tiene actividad biológica, indicando que la adsorción del anti-  
5 biótico sobre la resina es sustancialmente completa. Cuando todo el caldo filtrado, comprendiendo aproximadamente 88 litros, ha pasado a través de la columna, la columna es lavada repetidamente con agua hasta que el efluente es incoloro.

10 La antelvencina es recuperada de la columna como sigue: la columna es eluída de forma continua con una mezcla que comprende 30% (volumen/volumen) de acetona y 70% de ácido clorhídrico acuoso 0,5 N, en tanto que el efluente continua dando un ensayo positivo con el reactivo  
15 de Ehrlich. Se recoge un total de aproximadamente 10,4 litros de eluato. El eluato es ajustado a aproximadamente un pH 5,5 con una solución de hidróxido de sodio acuoso al 10% y es concentrado a un volumen de aproximadamente 8,5 litros. Se añaden 3 volúmenes de acetona, con agitación,  
20 al eluato concentrado, y el pH de la mezcla resultante es ajustado nuevamente por encima de aproximadamente un pH 6,5. La mezcla es hecha pasar a través de una columna que contiene aproximadamente 1750 ml. de Florisil húmedo de 149-250 micras para separar pigmentos y alquitranes.  
25 Subsiguientemente la columna es lavada con acetona acuosa al 75% hasta que el efluente es negativo al reactivo de Ehrlich. El efluente original y el producto lavado son combinados y concentrados hasta un volumen de aproximadamente 9 litros, y se añaden a éstos 2.250 g. de cloruro  
30 de sodio. El residuo alquitroso oscuro que se forma es se



parado por filtración, y el filtrado resultante es extraído tres veces con porciones de 90 ml. de alcohol bencílico. El agua residual es separada de los extractos combinados bajo vacío y la solución resultante de alcohol bencílico es añadida lentamente con rápida agitación a 9 volúmenes de acetona. Después de un almacenamiento durante la noche a aproximadamente 3°C, el sólido precipitado es recuperado por filtración, lavado completamente con acetona y secado "in vacuo". El clorhidrato de antelvencina así obtenido puede ser empleado seguidamente para nueva purificación o para conversión en otra sal de antelvencina, tal como se describe en los ejemplos subsiguientes.

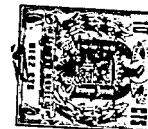
Ejemplo 3: Preparación de 2-naftalenosulfonato de antelvencina

A una solución de 1 g. de clorhidrato de antelvencina, preparada como en el ejemplo 2, se añaden 40 ml. de una solución acuosa al 5% de 2-naftaleno sulfonato de sodio. La mezcla es calentada para realizar una solución completa y es seguidamente dejada enfriar lentamente. Un aceite oscuro, que comienza a separarse cuando la temperatura de la solución llega aproximadamente a 20°C, es separado por centrifugación, y la solución flotante es enfriada para realizar la cristalización de 2-naftaleno sulfonato de antelvencina.

Ejemplo 4: Preparación de salicilato de antelvencina

A 30 ml. de una solución acuosa al 5% de salicilato de sodio se añade 1 g. de clorhidrato de antelvencina

311094

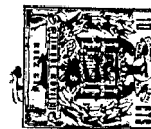


na, preparado tal como se describe en el ejemplo 2. La  
mezcla es calentada durante aproximadamente 10 minutos so  
bre un baño de vapor y es filtrada mientras está todavía  
caliente para separar los sólidos no disueltos. El filtra  
do transparente es dejado enfriar a la temperatura ambien  
te, y la cristalización es inducida rascando los lados  
del frasco con una varilla de vidrio. Al primer signo de  
cristalización, la mezcla es refrigerada a aproximadamente  
3°C para permitir que tenga lugar la cristalización com-  
pleta. Los cristales de salicilato de antelvencina son re  
cogidos por filtración, lavados dos veces sobre el filtro  
con porciones de 10 ml. de agua y hielo, y secados "in va  
cuo" sobre pentóxido de fósforo a la temperatura ambiente.  
La recrystalización se realiza a partir de una solución  
acuosa al 2% de salicilato de sodio.

Ejemplo 5: Preparación de antelvencina A exenta  
de antelvencina B

Una columna cromatográfica de 31 mm. de diáme-  
tro y 425 mm. de largo es rellena con celulosa especial-  
mente tratada, preparada como sigue: una suspensión de  
100 g. de polvo de celulosa Whatman (CN 70) es preparada  
y bien agitada durante 30 minutos aproximadamente. La celu  
losa es recuperada por filtración, y seguidamente es re-  
suspendida sucesivamente en ácido clorhídrico 0,2 N, agua,  
y una mezcla disolvente de n-butanol, piridina, ácido acé  
tico, y agua en la proporción 15:10:1:12.

Una solución de 5 g. de clorhidrato de antelven  
cina, preparado tal como se describe en el ejemplo 2, en  
40 ml. del sistema disolvente antes descrito, es hecha pa



sar a través de la columna. La columna está equipada con un colector de fracciones automático ajustado a intervalos de 30 minutos, y la velocidad de circulación de la columna es controlada para proporcionar aproximadamente 5 a 7 ml. de efluente durante este intervalo de tiempo. El curso del fraccionamiento cromatográfico es vigilado examinando el efluente en cada quinto tubo por medio de cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice. Los dos componentes son distinguidos fácilmente sobre placas cromatográficas en virtud del hecho de que las sales de antelvencina A se mueven mucho más rápidamente en este sistema que los correspondientes derivados de antelvencina B, siendo los valores  $R_f$  en ese sistema de 0,5 y 0,3 respectivamente. Las fracciones que por esta técnica se determina que contienen solamente antelvencina A son reunidas y concentradas hasta sequedad. El clorhidrato de antelvencina A sólido así obtenido puede ser purificado de nuevo o puede ser convertido en otras sales de antelvencina A por la técnica descrita en los ejemplos 4 y 5.

Las fracciones que contienen solamente antelvencina B son reunidas y tratadas de la misma manera. Las fracciones intermedias que contienen a la vez antelvencina A y antelvencina B, pueden ser sometidas a nueva cromatografía para realizar una nueva resolución, dando como resultado el aislamiento de cantidades adicionales de los componentes individuales puros.

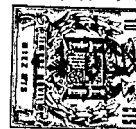
311094



H O T A

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

10 1.- Un procedimiento para preparar un concentrado o composición de piensos, caracterizado porque se forma de modo que contenga un compuesto del grupo que consta del antibiótico antelvincina, y sus sales de adición de ácido, caracterizándose dicho antibiótico, en la forma de su sal de adición 2-naftalensulfonato, como un sólido blanco cristalino que funde a aproximadamente 181-183°C, que es soluble en agua caliente, metanol, alcohol bencílico, dimetilformamida, dimetil sulfoxido, fenol y metil cellosolve, es ligeramente soluble en etanol y es relativamente insoluble en agua fría, isopropanol, acetona, acetato de etilo, éter, cloroformo, y benceno, que es básico, teniendo unos índices de pK'a de 9,58 y 11,95 determinados por valoración electrométrica en dimetilformamida acuosa al 66%; que tiene un peso molecular aparente calculado partiendo de los datos de valoración, de aproximadamente 847; que tiene la composición aproximada de 54,78% de carbono, 5,23% de hidrógeno, 14,66% de nitrógeno, 7,41% de azufre y 17,38% de oxígeno; que, cuando está amasado con aceite mineral, tiene las siguientes bandas perceptibles en su espectro de absorción de radiaciones infrarrojas sobre el margen de 2,0 a 15,0 micras: 2,79, 3,04, 3,20, 31,41, 3,48, 5,86, 5,91 (saliente), 6,08, 6,26, 6,47, 30 6.60 (saliente), 6,83, 6,95, 7,07, 7,22, 7,40, 7,55, 7,88,



8,35 (ancho), 8,55, 8,65, 8,79, 9,11, 9,36, 9,64, 10,19  
(débil) 10,30, 10,49, (débil), 10,58, 10,95, 11,11, 11,25,  
11,52, 12,16, 12,39, 12,98, 13,17, 13,38, 13,89, y 14,78  
micras; teniendo una muestra del mismo secada en vacío  
5 una rotación específica de + 11,7° determinada a 25°C en  
etanol acuosa del 95% en el que la concentración de la  
sal antibiótica es del 1% sobre una base de peso por volu-  
men; que da un resultado positivo en el ensayo de Ehrlich  
y resultados negativos en el ensayo con ninhidrina para  
10 alfa-aminoácidos y en el ensayo de Sakaguchi para grupos  
de guanidina, y que tiene un espectro de absorción de ra-  
diaciones ultravioleta en solución acuosa que presenta  
máximos de absorción a aproximadamente 225 milimicras y  
285 milimicras con índices de absorción de  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} =$   
15 2.180 y 330 respectivamente.

2.- El procedimiento de la reivindicación 1,  
caracterizado porque se emplea la sal de antelvencina del  
ácido 2-naftalensulfónico o la sal de antelvencina del  
ácido salicílico.

20 3.- El procedimiento de las reivindicaciones  
1 ó 2, caracterizado porque se emplea una sal de adición  
de antelvencina A y/o antelvencina B.

4.- Procedimiento para producir antelvencina  
adecuada para su uso en el procedimiento de cualquiera  
25 de las reivindicaciones 1 a 3, que se caracteriza por cul-  
tivar un organismo seleccionado del grupo que consta de  
*Streptomyces venezuelae* ATCC 14.583, *Streptomyces venezue-  
lae* ATCC 14.584 y *Streptomyces venezuelae* ATCC 14.585 en  
un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de  
30 carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, bajo condiciones

3 1 1 0 9 4



aerobias sumergidas hasta que se produce una cantidad sustancial de antelvencina por dicho organismo en dicho medio de cultivo.

5 5.- El procedimiento de la reivindicación 4, caracterizado porque se recupera la antelvencina desde dicho medio de cultivo.

10 6.- El procedimiento de las reivindicaciones 4 ó 5, caracterizado porque se convierte la antelvencina en una sal de adición de ácido terapéuticamente aceptable de la misma.

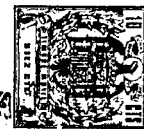
15 7.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque se mantiene el medio de cultivo a una temperatura de aproximadamente 26-33°C y el crecimiento del organismo se lleva a cabo durante un período de aproximadamente 4 a 10 días.

20 8.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que se caracteriza además por someter la antelvencina, en la forma de una sal de adición de ácido, a cromatografía fraccionada, obteniéndose así las sales de antelvencina A y antelvencina B como sustancias separadas a partir de las fracciones recogidas desde la columna cromatográfica.

9.- Un procedimiento para preparar un concentrado o composición de piensos.

25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en el dibujo que se acompaña y para los fines que se han especificado.

311094



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

Madrid,

11 JUN 1957

P. A.

Alberto de Esaburn  
Pro. P. A.

M. O. M.

311094

311094

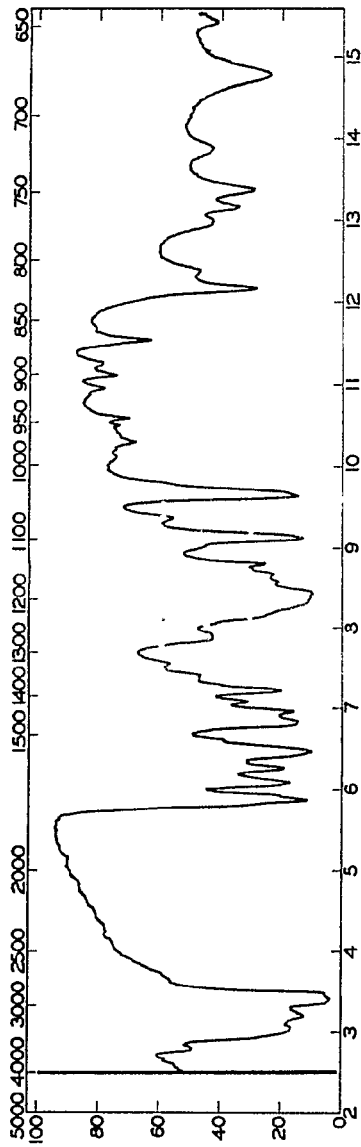


FIG. 1

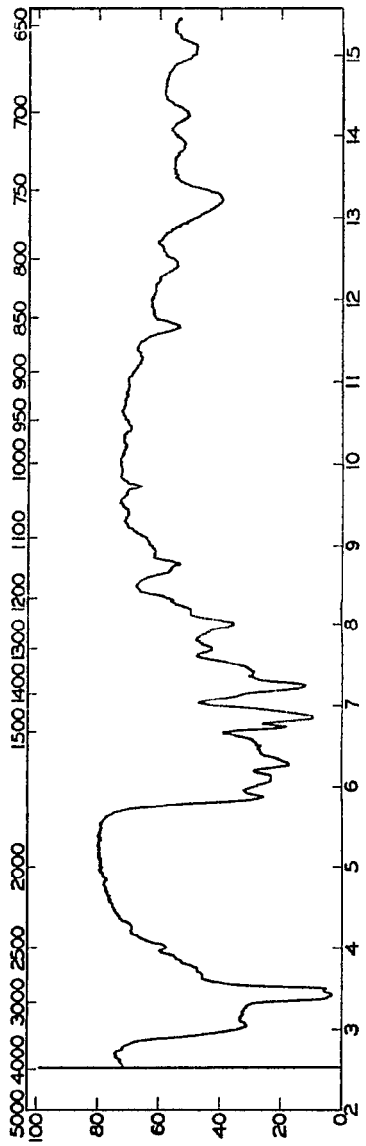


FIG. 2

Alfabeto de Escobedo  
Per Pange

311094

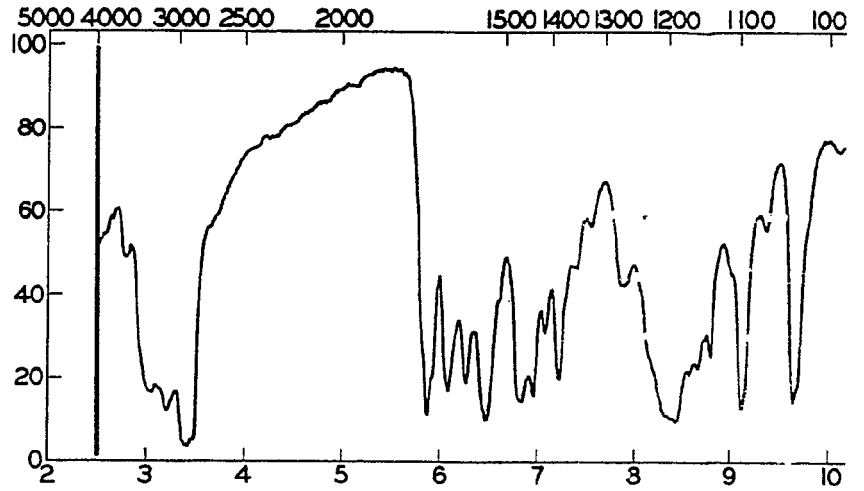


FIG. 1

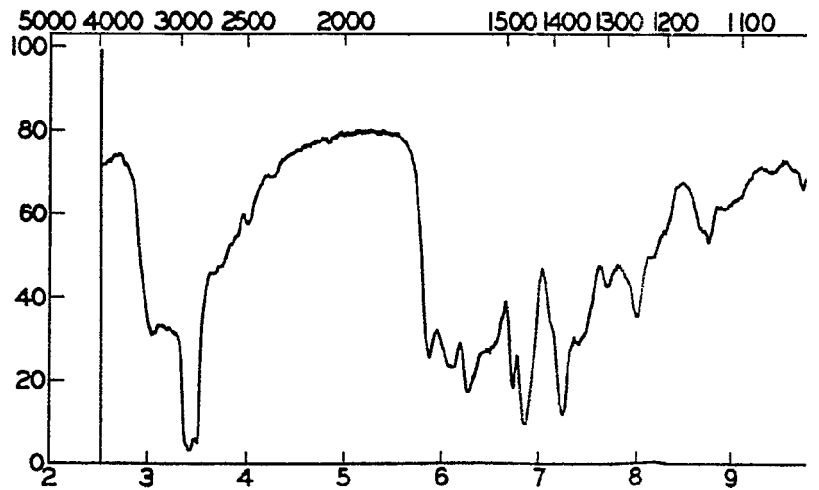


FIG. 2

311094

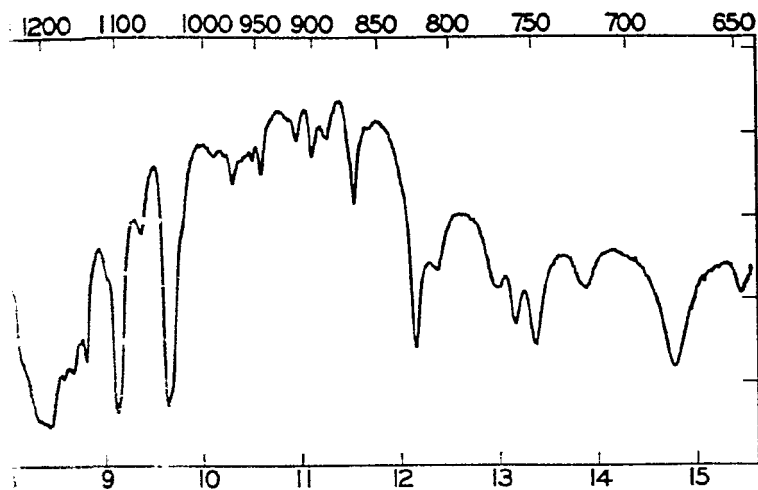
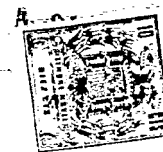


FIG. 1

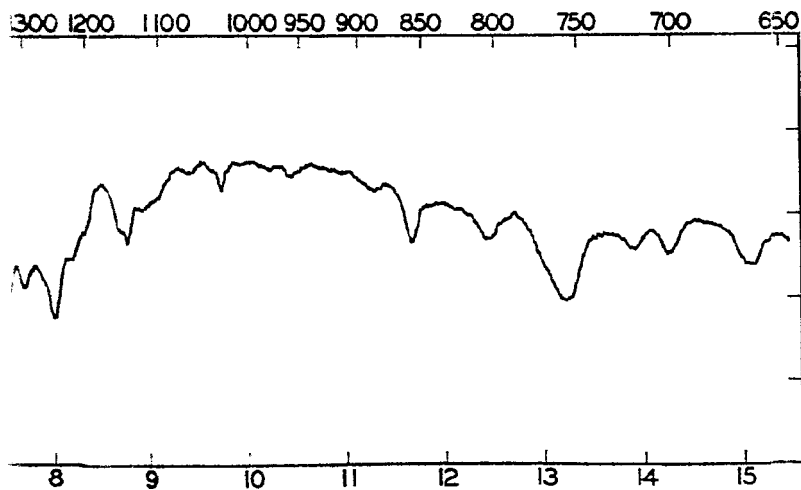


FIG. 2

Alberto de Elzabura  
Por Poder