



P- 31.107

U.S. Ser No 430135
493461-S

322482

322482

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud
de

PATENTE DE INVENCION

formulada el 1 de febrero de 1966, con el núm. 322.482

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de E.R. SQUIBB & SONS, INC., entidad norteamericana,
establecida en 745 Fifth Avenue, Nueva York, N. Y., Estados
Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR PRASINOMICINA"

=====
La presente invención se refiere a nuevas sustan-
cias antibióticas, a métodos para su producción por fermen-
tación, y a métodos para su concentración, purificación y
aislamiento.

5 La mezcla de nuevas sustancias antibióticas de la
invención se denomina en lo sucesivo prasinomicina, genérica-
mente y en mezcla, y los componentes individuales se denomi-
nan prasinomicina A, prasinomicina B, prasinomicina C, prasi-
nomicina D y prasinomicina E. La prasinomicina se produce
10 por cultivo, bajo condiciones controladas, de ciertos micro-

322482

10 MAR



organismos Streptomyces. Entre ellos se encuentra una cepa de Streptomyces prasinus ATCC 15.825, aislado de muestras de tierra obtenidas en Colorado Springs, Colorado; Streptomyces hirsutus y Streptomyces prasinopilosus.

5 El Streptomyces prasinus que se puede emplear en la práctica de la invención se puede aislar y caracterizar agitando primero una parte de la muestra de tierra en agua destilada estéril, y cultivando sobre lámina en un medio de agar que contiene los siguientes materiales: agar, 15 g; sa
10 carosa, 10 g; ácido cítrico, 1,2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,4 g; KCl, 0,08 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,418 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,036 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,023 g; $\text{ZnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,021 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,004 g; y agua destilada, c.s. para 1000 ml.

El medio se ajusta a un pH igual a 7,0, y se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 30 min. Tras una
15 incubación de 7 a 10 días a 25°C, se aíslan de la tierra sometida a cultivo sobre lámina las colonias de Streptomyces prasinus. Después se cultivan estas colonias aisladas en un medio que contiene: extracto de carne de vacuno, 1,5 g;
20 extracto de levadura, 3,0 g; peptona, 6,0 g; dextrosa, 1,0 g; y agua destilada, c.s. para 1000 ml.

El medio se trata en autoclave a 121°C durante 15 min. El organismo es capaz de utilizar las siguientes fuentes de carbono, en un medio fundamental que contiene
25 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno: glucosa, manita, inosita, xilosa, arabinosa y fructosa. El cultivo no es sustentado por la sorbita, ramnosa y lactosa.

El organismo es proteolítico en la leche y gelatina, hidroliza el almidón, es negativo al H_2S , y no reduce
30 los nitratos.



Lo que sigue es una descripción de colonias de los microorganismos, incubadas en diversos medios:

Pasta de tomate-harina de avena-agar; el micelio aéreo es verde (moho). El inverso es verde artemisa M+P₁₆E₅.

5 Levadura-extracto de malta-agar; el micelio aéreo es verde (moho) el inverso es verde cremoso. No se producen pigmentos solubles.

10 Una sal sintética-levadura-agar; el micelio aéreo es verde hierba, haciéndose verde grisáceo oscuro al envejecer, y el inverso es marrón rojizo. No se producen pigmentos solubles.

15 Las características generales de los microorganismos son: color verde de las esporas, esporóforos en garfios o espirales primitivas, y no son cromógenos en medios proteicos. Estas características sitúan al organismo en la serie viridus V de Waksman.

20 La prasinomicina (y todos sus componentes) posee amplia actividad frente a las bacterias gram positivas y Mycobacterium tuberculosis, y una actividad limitada frente a las bacterias gram negativas.

25 Para formar los antibióticos, los organismos deseados se pueden cultivar a 25°C bajo condiciones aerobias sumergidas, en un medio nutritivo acuoso que contenga un carbohidrato asimilable y una fuente de nitrógeno. La fermentación se efectúa durante aproximadamente 168 horas, al cabo del cual periodo se han formado los antibióticos.

30 Una vez completada la fermentación, la prasinomicina se extrae del micelio con metanol, o bien, preferiblemente, se extrae de la totalidad del caldo de fermentación, ajustando primero el caldo a un pH de 1,5 a 3,0, con ácido clor-



hídrico; eliminando todos los sólidos por filtración; y extrayendo con metanol la torta de filtración.

Los extractos metanólicos se neutralizan a un pH igual a 7, y se concentran a vacío, quedando una suspensión acuosa. La suspensión acuosa se trata con un ácido mineral, para ajustar el pH a 1,5, y luego se extrae con cloroformo o butanol. Después se puede secar la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro, y se puede concentrar hasta un volumen pequeño. El concentrado se diluye con de 3 a 10 volúmenes de acetona, precipitando así el antibiótico crudo.

La prasinomicina cruda se puede purificar más, suspendiéndola en agua destilada y ajustando el pH a aproximadamente 8,5, por adición de hidróxido sódico. La solución acuosa básica se extrae con n-butanol, para eliminar el material neutro. Se acidifica la fase acuosa hasta un pH igual a 1,5, con HCl, y se extrae con n-butanol. El extracto en butanol se concentra a vacío, dando un producto amorfo marrón oscuro.

Preferiblemente, la prasinomicina cruda se purifica suspendiéndola en 10 veces su peso de agua destilada, y ajustando el pH a aproximadamente 8,5, por adición de hidróxido sódico. La solución acuosa básica se lava con n-butanol, para eliminar el material neutro. La fase acuosa se ajusta a pH 5 y se lava de nuevo con n-butanol. La fase acuosa se ajusta a un pH de 1,5 a 2,0, y se extrae con n-butanol. El extracto en butanol se neutraliza con hidróxido sódico, y la mezcla se evapora a sequedad. Se obtiene el ácido libre, y se eliminan los iones sodio, poniendo en contacto una solución acuosa de la sal sódica con una resina intercambiadora de iones fuertemente ácida.



La separación de los cinco componentes de la mezcla antibiótica se efectúa por distribución en contracorriente, en atmósfera de nitrógeno, o por cromatografía en papel, con separación.

5 La invención se puede ilustrar más por los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

Se siembra *Streptomyces prasinus* (ATCC 15825) en planos inclinados sobre pasta de tomate-harina de avena-agar. Se incuban durante de 7 a 10 días, y luego se usan para inocular 100 ml de un medio acuoso de harina de soja, contenidos en matraces Erlenmeyer de 500 ml. La composición del medio de germinación es: harina de soja, 15 g; patata machacada deshidratada, 15 g; glucosa 50 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de una solución al 0,05%; CaCO_3 , 10 g; agar, 2,5 g; y agua destilada, 1 litro.

El medio se esteriliza durante 20 minutos a 121°C , y a una presión de vapor de agua igual a $1,05 \text{ kg/cm}^2$. Los matraces de germinación se incuban a 25°C durante de 72 a 96 horas, en un agitador rotatorio.

Se hace una transferencia del 10%, desde el matraz de germinación a unos matraces Erlenmeyer de 500 ml que contienen 100 ml del medio siguiente: harina de soja, 60 g; glucosa, 50 g; CaCO_3 , 10 g; agua destilada, 1 litro. Los matraces de fermentación se incuban y agitan, igual que los matraces de germinación. Se toman muestras a los 3, 5 y 7 días. Se preparan separando el micelio por centrifugación, extrayendo el micelio con un volumen de metanol igual al volumen de lo que sobrenada, y haciendo la determinación por un método de difusión de agar. Los resultados son los si-

322482

10



güentes:

	<u>Horas</u>	<u>Actividad biológica</u> <u>(unidades de difusión/ml)</u>
	72	16,8
	120	26,2
5	168	42,5

El organismo determinado es Staphylococcus aureus 209P.

Ejemplo 2

Una tanda de 570 litros de Streptomyces prasinus (ATCC 15.825) se fermenta de la siguiente forma:

(A) Preparación de la inoculación (Inoculum)

Fuente de inoculación: Cultivo de Streptomyces prasinus (ATCC 15.825) conservado por liofilización en leche:

15 Medio:

	Harina de soja	15 g
	Patata machacada deshidratada	15 g
	Glucosa	50 g
	CoCl ₂ ·2H ₂ O	10 ml de solución al 0,05%
20	CaCO ₃	10 g
	Agar	2,5 g
	Agua destilada	1 litro

Se incuban 125 ml del medio, en un matraz de 500 ml, durante 96 horas a 25°C, en el agitador rotatorio. Se añaden 125 ml del anterior cultivo a 1000 ml del anterior medio, salvo en que se prescinde del agar, en un matraz de 4000 ml, y se incuban durante 48 horas a 25°C, en un agitador alternativo. Luego se añaden 1000 ml del material resultante a 227 litros de un medio de la siguiente composición, y se incuba durante 72 horas.

Medio

	Harina de soja	15	g.
	Almidón hidrolizado	15	g.
	Cerelosa	55	g.
5	CaCO ₃	10	g
	CoCl ₂ ·2H ₂ O	0,005	g
	Agua destilada	1	litro

10 Durante la incubación se airea el caldo, con una velocidad superficial de aire igual a 30,5 cm/min. y agitación durante las primeras 12 horas, y luego con velocidad superficial de aire igual a 91,5 cm por minuto y agitación. Se añaden 34 litros del material resultante a 570 litros de un medio de la siguiente composición, y se incuba durante 168 horas, con aireación y agitación.

15

Medio

	harina de soja	60	g
	Cerelosa	55	g
	CaCO ₃	10	g
	Antiespumante	0,05	%

20

El caldo de fermentación se acidifica a un pH de 1,5 a 3,0, con ácido clorhídrico; se añaden 6 kg de un auxiliar de filtración; y se separa por filtración todo el material insoluble.

EJEMPLO 3

25

Diez kilos de la torta de filtración obtenida en el Ejemplo 2 se extraen dos veces con metanol, usando porciones de 15 litros de metanol, durante una hora. Entre las extracciones se filtra la torta. El filtrado combinado se ajusta a un pH de 6 a 7 con hidróxido sódico, y la solución se concentra a vacío, para separar el metanol quedando una

30

322482

10



suspensión acuosa de aproximadamente un litro.

La suspensión acuosa obtenida por concentración del extracto metanólico se ajusta a un pH igual a 1,5, con HCl, y se extrae tres veces con cloroformo, usando 0,25 volúmenes de cloroformo cada vez. Se determina el pH después de cada extracción, y, si es necesario, se vuelve a ajustar a 1,5. Los extractos rebalsados de cloroformo se concentran a vacío, formando un jarabe espeso.

Se añaden cuatro litros de acetona al jarabe espeso obtenido en el Ejemplo 3, y la mezcla se agita durante una hora y se filtra. Se seca la torta bajo vacío, a temperatura ambiente. A partir de 555 g del jarabe espeso se obtienen 61,1 g de un sólido amorfo insoluble en acetona, de color tostado, de actividad igual a 725 unidades/mg.

EJEMPLO 4

Sesenta gramos del producto insoluble en acetona obtenido en el Ejemplo 3 se muelen formando un polvo fino, con mortero y mano de mortero, se suspenden en 3,2 litros de agua (pH igual a 3,4) y se ajustan a un pH igual a 8,6, por adición de NaOH 2,5 N (25 ml), con agitación. Se desprecian las trazas restantes de material insoluble. La solución acuosa básica se extrae tres veces con porciones de 800 ml de n-butanol. La resultante fase acuosa de color rojo oscuro se acidifica a un pH igual a 2, con HCl al 5% (82 ml), y se extrae tres veces con porciones de 800 ml de n-butanol. Los extractos en butanol combinados se concentran bajo vacío, dando un producto ácido amorfo, marrón oscuro, en cantidad de 29,0 gramos y con actividad igual a 2200 unidades/mg.

Se puede efectuar una purificación mayor por distribución en contracorriente de la fracción ácida del siste-



ma, cloroformo/metanol/agua (5/4/2 vol/vol/vol). Luego se vuelve a distribuir la fracción activa, con un sistema disolvente de n-butanol, acetato de etilo/agua (2/1/3 vol/vol/vol). Los tubos que contienen la fracción activa se combinan, se someten a evaporación a sequedad bajo vacío, se disuelve el residuo en metanol, y el producto incoloro precipitó por adición de acetato de etilo. Se obtiene una prasinomicina con potencia de 2655 unidades/mg, con p.f. (con descomposición) igual a de 164 a 165°C, y que tenía el espectro infrarrojo que se muestra en la figura 1.

La sustancia se hidrata fácilmente por exposición al aire, captando 7,2% en su peso de agua, que se pierde secando a 80°C a 0,1 mm de presión.

Análisis (forma hidratada) : C, 46,18%
H, 7,17%
N, 4,05%
P, 2,37%
O, 40,23% (por diferencia)

Equivalente de neutralización, por titulación con hidróxido sódico = 697.

La hidrólisis de la prasinomicina con ácidos fuertes libera ácido fosfórico y sustancias positivas a la ninhidrina, incluyendo D-glucosamina y 6-desoxi-D-glucosamina.

El material es negativo cuando se ensaya con ninhidrina o nitrato de plata, pero da color azul cuando se trata con hipoclorito de terc-butilo al 2%, disuelto en ciclohexano, seguido por una solución de almidón/yoduro potásico.

EJEMPLO 5

Diez gramos del polvo insoluble en acetona obtenido por el método descrito en el Ejemplo 3, se muelen formando un polvo fino, con mortero y mano de mortero, se suspenden en 100 ml de agua (pH = 3,4), y se ajustan a un pH igual a 9, por adición de NaOH 2,5 N (4,3 ml) con agita-



ción. Se desprecian las trazas restantes de material insoluble. La solución acuosa básica se extrae tres veces con porciones de 75 ml de n-butanol. La resultante fase acuosa de color rojo oscuro se ajusta a un pH igual a 5, con HCl 6 N (0,35 ml), y se lava dos veces con porciones de 75 ml de n-butanol. La fase acuosa se acidifica a un pH de 1,5 a 2,0, con HCl 6 N (0,6 ml), y se extrae dos veces con porciones de 75 ml de n-butanol. Los extractos en butanol de la última extracción, combinados, se ajustan a un pH igual a 7, con NaOH, y se concentra la mezcla bajo vacío, produciendo la sal sódica amorfa, en cantidad de 2 g, con actividad de 3.440 μ /mg.

Para preparar el ácido libre, se disuelve 1 gramo de la sal sódica en 25 ml de agua destilada, y se libera el ácido por adición de una resina cambiadora de iones fuertemente ácida, hasta que el pH de la solución es de aproximadamente 2,5. Se separa la resina por filtración, y el ácido libre se recupera del filtrado acuoso por secado por congelación, produciendo 0,7 g de un polvo de color tostado claro, con actividad de 3200 μ /mg.

EJEMPLO 6

Se hicieron determinaciones de dilución de tubos al doble, con varios microorganismos. La prasinomicina usada en este estudio es equivalente en pureza a la fracción ácida descrita en el Ejemplo 4.

<u>Organismo</u>	<u>Mínima concentración inhibitoria (μg/ml)</u>
<u>Staphylococcus aureus</u> 209P	0,09
<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	0,24
<u>Streptococcus agalactiae</u>	0,25
<u>Salmonella schottmuelleri</u> N ^o 3850	$\geq 50,0$

322482



<u>Organismo</u>	<u>Minima concentración inhibitoria (µg/ml)</u>
<u>Salmonella typhimurium</u> N° 3821	≥50,0
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> N° 3840	≥50,0
<u>Proteus vulgaris</u> N° 3855	25,0
5 <u>Proteus mirabilis</u> N° 3873	18,7
<u>Candida albicans</u> N° 1539	≥50,0
<u>Mycobacterium tuberculosis</u> var. BCG	1,0

EJEMPLO 7

Se inyectan por vía intraperitoneal a unos ratones 1000 DL₅₀ dosis de Streptococcus pyogenes C203, y cinco horas después de la infección se les administra por vía subcutánea la mezcla antibiótica, con los siguientes resultados:

TABLA 1

<u>Droga</u>	<u>Mg/Kg</u>	<u>S/T.</u>
Penicilina G	2	2/10
	1	3/10
	0,5	1/10
Prasinomicina	10	10/10
	5	6/10
	2,5	8/10
	1,25	4/10
Sin tratamiento	----	0/10

* Supervivientes/Total de ratones tratados.

25 EJEMPLO 8Sales metálicas de la prasinomicina

Se suspende prasinomicina en agua (30 mg/ml). Se añade solución de hidróxido bórico, hasta un pH igual a 8, y se agita la solución hasta la total disolución del antibiótico. Se añaden 5 volúmenes de etanol, y el precipi



tado de sal b́arica se separa por filtraci3n y se lava con etanol. Por exposici3n al aire, la sal se hidrata en magnitud de 9,7% su peso de agua, la cual se pierde al secar a 80°C y 0,1 mm de presi3n.

5 Análisis (forma hidratada): C, 40,93%
 H, 6,25%
 Ba, 9,22%
 P, 1,79%

Equivalente de neutralizaci3n (titulaci3n con ́cido per-
10 cl3rico) = 647.

Analogamente, siguiendo el m3todo del Ejemplo 8, pero sustituyendo el hidr3xido b́arico por cantidades equivalentes de hidr3xido s3dico o hidr3xido potásico, se obtienen las respectivas sales s3dica y potásica.

15 EJEMPLO 9

Siguiendo el m3todo de los Ejemplos 2, 3 y 4, pero sustituyendo el Streptomyces prasinus del Ejemplo 2 por Streptomyces hirsutus (ATCC 19.091), se obtiene prasinomicina.

20 EJEMPLO 10

Siguiendo los m3todos de los Ejemplos 2, 3 y 4, pero sustituyendo el Streptomyces prasinus del Ejemplo 2 por Streptomyces prasino-pilosus (ATCC 19.092), se obtiene prasinomicina.

25 EJEMPLO 11

Se aislan la prasinomicina A, prasinomicina B, prasinomicina C, prasinomicina D y prasinomicina E, por distribuci3n en contracorriente del material del Ejemplo 5, usando el sistema disolvente n-propanol/n-butanol/N-etilmorfolina 0,2M (2/3/6 en volumen). El ́cido (4,4 gramos)
30 se disuelve en 200 ml de la fase inferior, se ajusta a un



pH igual a 9, con N-etilmorfolina, y se somete a 1500 transferencias en un aparato de distribución en contracorriente, en atmósfera de nitrógeno gaseoso.

5 Se combina el material de los tubos, correspondiente a los componentes activos individuales, y se elimina el disolvente bajo vacío. Las sales resultantes de N-etilmorfolina se recogen en agua, y se liberan los ácidos libres por tratamiento con la resina cambiadora de iones. Se separa la resina por filtración, y el filtrado se concentra a
10 sequedad bajo vacío. Se precipita el residuo de la solución en metanol, por adición de acetato de etilo, para producir los antibióticos amorfos e incoloros. Por este procedimiento se obtuvieron 600 mg de prasinomicina A, 506 mg de prasinomicina B y 412 mg de prasinomicina C.

15 Los otros componentes, prasinomicina D y prasinomicina E, aunque no se han aislado aún, se resuelven por cromatografía en papel con partición, y se detectan por bioautografía. Se hace una mancha de 0,1 µg del material obtenido en el Ejemplo 3, sobre papel de filtro (por ejemplo Munktells Nº S-302) lavado dos veces con ácido, de 56
20 cm de longitud, y la hoja de papel de filtro se sumerge en una solución de acetona y fase inferior del sistema disolvente (2:1 en volumen). La hoja se seca al aire a temperatura ambiente (2 a 3 minutos), para separar la acetona, y
25 luego se revela con la fase superior de un sistema disolvente consistente en n-butanol, piridina y agua (4/1/4 en volumen) durante 16 horas, a temperatura ambiente. Los disolventes se eliminan por secado al aire, y la hoja se bioautografa sobre agar sembrado con Staphylococcus aureus 209P.
30 La prasinomicina A se caracteriza por un valor R_f de 0,23;



la prasinomicina B por un R_f de 0,28; la prasinomicina C por un R_f de 0,36; la prasinomicina D por un R_f de 0,38; y la prasinomicina E por un R_f de 0,45.

Se preparan sales de las prasinomicinas, haciendo reaccionar la prasinomicina deseada con la base deseada. Se puede usar cualquier base. Entre tales bases se incluyen las bases metálicas, tales como los hidróxidos de metal alcalino (por ejemplo hidróxido sódico e hidróxido potásico), y los hidróxidos de metal alcalino-térreo (por ejemplo hidróxido bórico); y bases orgánicas tales como aminas primarias, secundarias y terciarias (por ejemplo dietilamina), y N-etilmorfolinoamina. La preparación de tales sales se ilustra por el siguiente ejemplo.

EJEMPLO 12

Se preparan las sales sódicas de las prasinomicinas, suspendiendo la prasinomicina deseada (en forma de su ácido libre) en agua, y añadiendo una solución acuosa 0,5N de hidróxido sódico, hasta que se consigue un pH igual a 8. Luego se agita la mezcla y se añaden 5 volúmenes de etanol, para precipitar la sal sódica. El precipitado se separa por filtración y se lava con etanol.

Los análisis elementales de la prasinomicina A, prasinomicina B y prasinomicina C, medidos como ácidos libres anhidros, se indican en la tabla siguiente, junto con sus equivalentes de neutralización, obtenidos por titulación con hidróxido sódico en agua.



10 MAR

322482

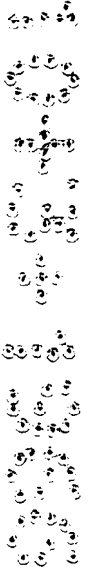


TABLA 2

Hallado, %

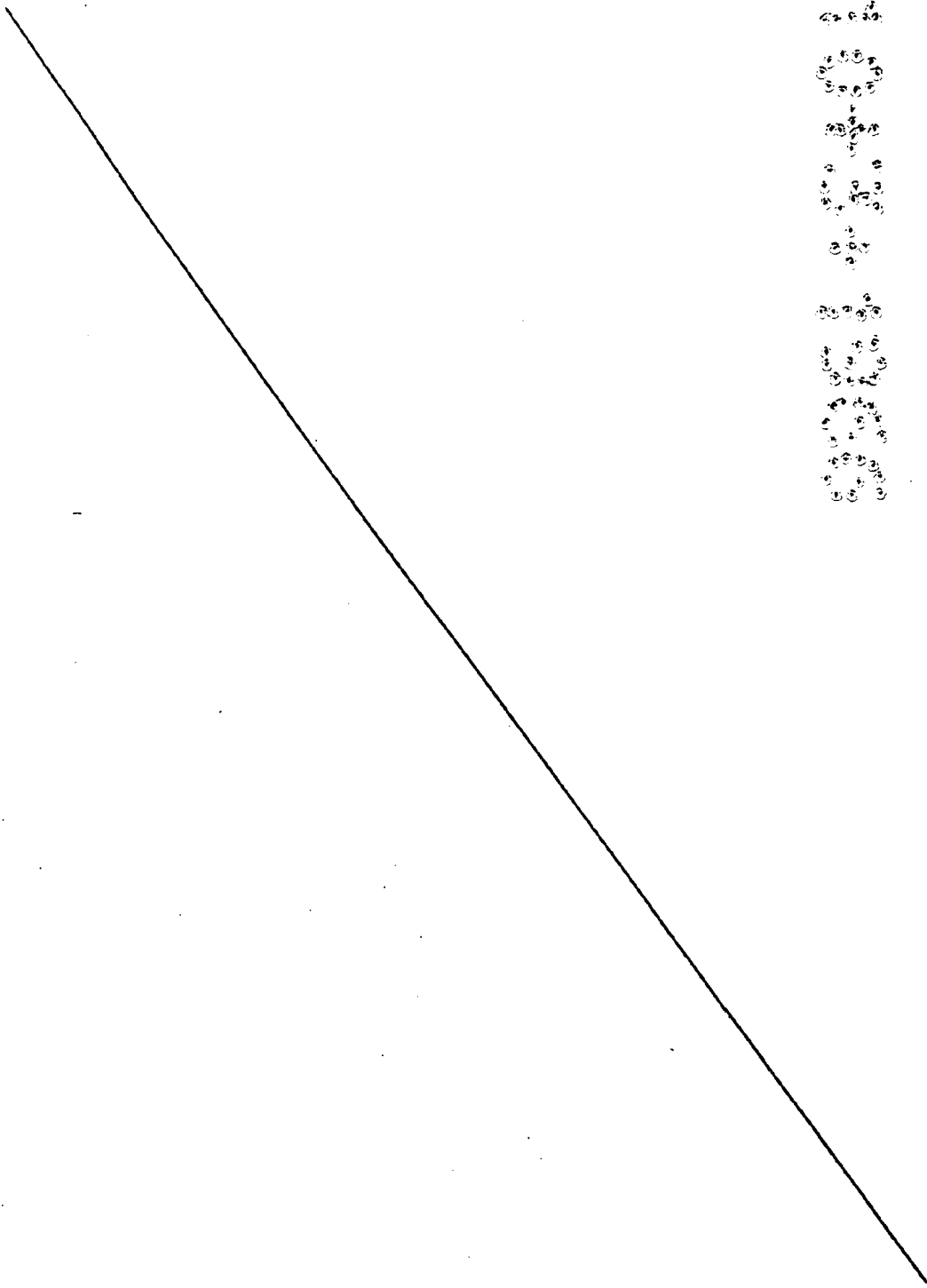
Compuesto	Hallado, %					Equivalente de neutralización
	C	H	N	P	N-OAc	
Prasinomicina A	48,52	6,51	4,42	2,43	6,52	460
Prasinomicina B	50,72	6,70	4,76	2,30	6,33	430
Prasinomicina C	51,36	7,53	4,34	2,28	6,31	646

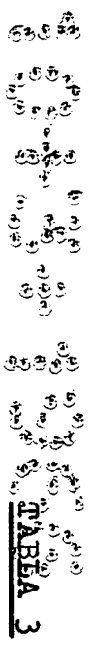
322482

10



En la tabla siguiente se indican otras propiedades físicas de las prasinomicinas. Los espectros infrarrojos se obtuvieron con la sal sódica de la prasinomicina indicada, en gránulos de KBr:





$\frac{H_2O}{R/D}$ Ultravioleta, um (E^{1%})

R_f

Coefficiente de

Espectro

Compuesto (ácido libre) 0,1 N-HCl 0,1 N-KOH I * II** distribución*** infrarrojo

Compuesto	(ácido libre)	0,1 N-HCl	0,1 N-KOH	I *	II**	distribución***	infrarrojo
Prasinomicina A	† 0,89	246 (6,0)	256 (8,2)	0,23	0,25	0,17	Figura 2
Prasinomicina B	† 2,89	246 (42)	257 (90)	0,28	0,25	0,24	Figura 3
Prasinomicina C	† 4,49	244 (7,2)	257 (9,4)	0,36	0,39	0,39	Figura 4
Prasinomicina D				0,38	0,39	0,43	
Prasinomicina E				0,45	0,62	0,85	

1

- * n-butanol/piridina/agua (4/1/4 en volumen)
 - ** n-propanol/n-butanol/N-etilmorfolina 0,2 M (2/3/4 en volumen)
 - *** n-propanol/n-butanol/N-etilmorfolina 0,1 M (2/3/6 en volumen)
- Experiencia de distribución en contracorriente, en atmósfera de nitrógeno.



El espectro in vitro de las prasinomicinas, tal como se determina por una determinación de dilución en tubo al doble, se indica en la siguiente tabla:

TABLA 4

5	Organismo	Mínima concentración inhibitoria, ($\mu\text{g/ml}$) de prasinomicina		
		A	B	C
	<u>Staphylococcus aureus</u> 209P	0,24	0,32	0,12
10	* <u>Staphylococcus aureus</u> SC3184	0,24	0,32	0,24
	** <u>Staphylococcus aureus</u> SC2406	0,47	0,47	0,24
	<u>Bacillus cereus</u>	0,07	0,03	0,02
	<u>Bacillus megaterium</u>	0,19	0,19	0,04
	<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	0,42	0,28	0,14
15	<u>Streptococcus</u> sp. SC3966	0,004	0,003	0,003
	<u>Micrococcus lysodeikticus</u>	0,17	0,17	0,08
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	> 50	> 50	> 50
	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	> 100	> 100	> 100
	<u>Candida albicans</u>	> 100	> 100	> 100
20	<u>Aspergillus niger</u>	> 100	> 100	> 100

* Resistente a la penicilina, estreptomina, tetraciclina, 5-hidroxitetraciclina, 7-clorotetraciclina, eritromicina y oleandomicina.

** Resistente a la penicilina, estreptomina, neomicina y metilmicina.

Esta solicitud, que corresponde a las presentadas en Estados Unidos de América el 3 de febrero de 1965, bajo el número 430.135 y 6 de Octubre de 1965, bajo el número 493.461, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

322482 10 MAR



N O T A

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

5 1.- Un procedimiento para producir prasinomicina, caracterizado por cultivar los microorganismos *Streptomyces prasinus* ATCC 15.825, *Streptomyces hirsutus* o *Streptomyces prasino-pilosus* en un medio nutriente acuoso bajo condiciones aerobias.

10 2.- El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el microorganismo es cultivado bajo condiciones aerobias sumergidas.

15 3.- El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por formar sales de metales alcalinos de prasinomicina.

4.- Un procedimiento para producir prasinomicina. Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

20 Esta Memoria consta de diecinueve hojas escritas por una sola cara.

Madrid, 10 MAR 1962

P. A.

Alberto de E. S. S.
Por Poder

BG/.- *[Handwritten initials]*



322482

FIGURE 1

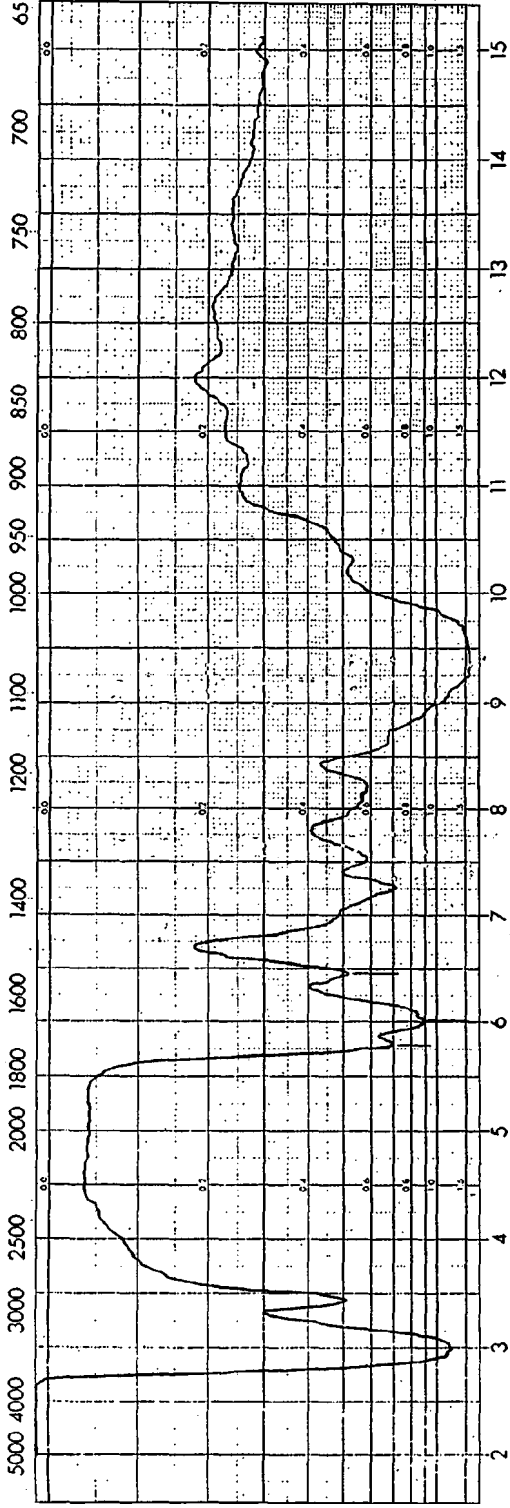
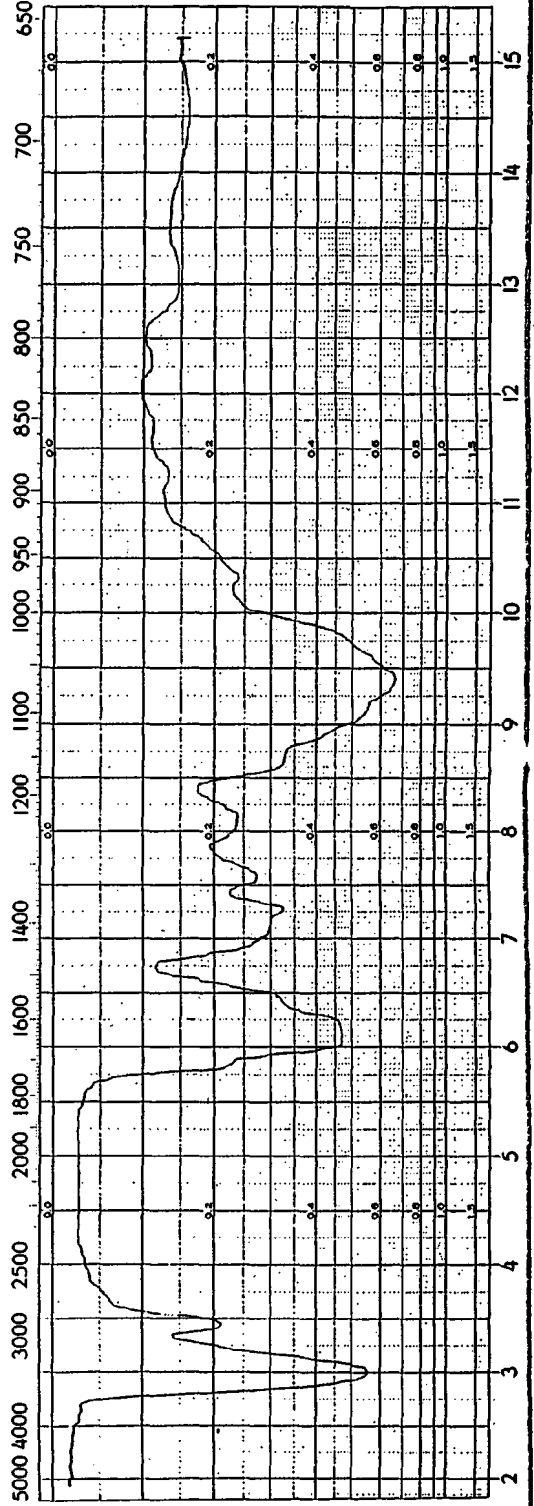


FIGURE 2



Handwritten signature or initials in the top right corner of the page.



FIGURE 3

322482

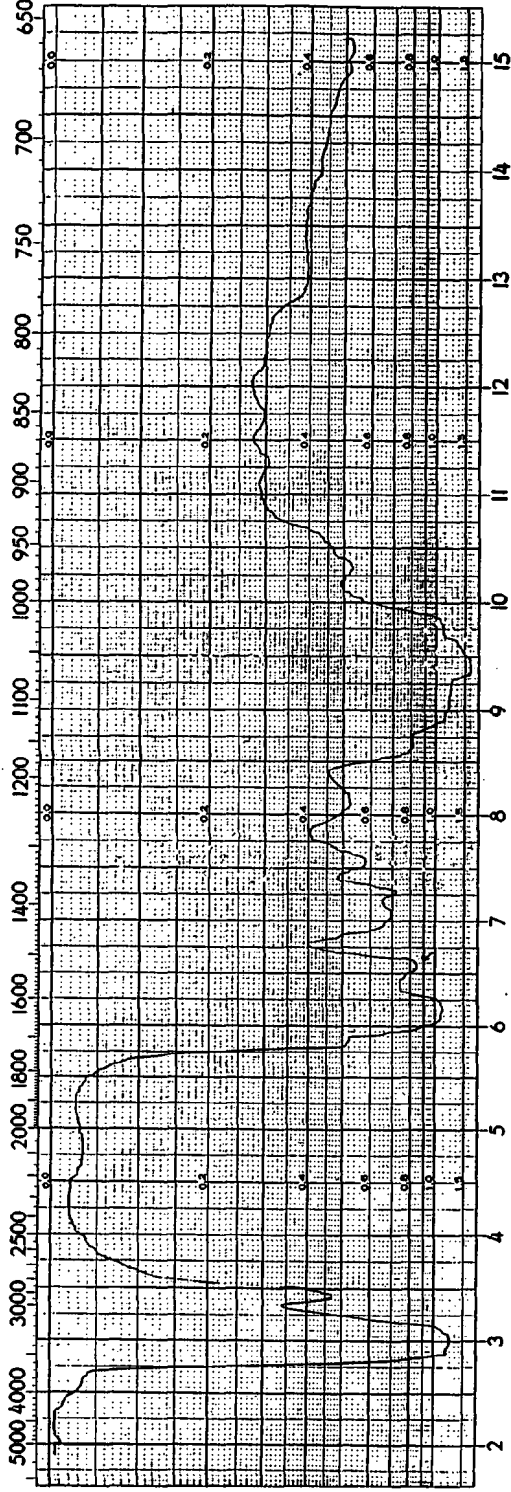


FIGURE 4

