

PATENTE DE INVENCION

SC. 2874/3039

337456

Memoria Descriptiva

sobre:

"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DEL
ANTIBIOTICO 16.511 R.P.".

Solicitante:

RHONE-POULENC, S.A., entidad francesa,
residente en : 22, Avenue Montaigne,
PARIS 8e, Francia.

Este invento se refiere a un nuevo anti-
biótico, designado a continuación por el número
16.511 R.P., y a su preparación. Este nuevo antibió-
tico se compone de cuatro constituyentes llamados
5. A, B, C y D el principal de los cuales, el constitu-

337456⁻²



337.456

yente B, se indica a continuación por el número 18.051 R.P. Este invento se refiere también a los constituyentes del 16.511 R.P. y a su preparación partiendo del 16.511 R.P.

5. Estos nuevos antibióticos tienen un interés muy especial debido a su actividad antibacteriana elevada, sobre determinados gérmenes Gram-positivos.

10. El 16.511 R.P. que puede presentarse en forma de ácido libre o de sal sódica, se obtiene por cultivo en un medio artificial de uno de los microorganismos identificados más completamente a continuación, perteneciente al género *Streptomyces*, y designado por las denominaciones "Streptomyces hygrosopicus var. tepidalitus DS 21336" (N.R.R.L. 3237), "Streptomyces lavendulae 22.097" (NRRL 3277), y "Streptomyces lavendulae 22.408" (NRRL 3278).

15. El 16.511 R.P. en forma ácida es muy soluble en metanol y etanol, soluble en cloruro de metileno, cloroformo, acetato de etilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y acetona; relativamente soluble en benceno y éter etílico, y prácticamente insoluble en agua, ciclohexano y hexano.

20. La sal sódica es fácilmente soluble en el agua (superior a 10% peso/volumen) y los alcoholes, poco solubles en acetona, y muy poco solubles en acetato de etilo y cloruro de metileno.

25. El 16.511 R.P. proporciona ensayos negativos en las reacciones siguientes: reacción con cloruro férrico, reacción con ninhidrina, reacción de Millon, reacción de Zimmermann y Bitto, reacción de Tollens y reacción de Sakaguchi. Proporciona ensayos positivos
- 30.



337456

2 MAR. 1957

en las reacciones siguientes: reacción de Folin-Denis, reacción de Ehrlich-Kovacs, reacción de diazotación, reacción de Fehling.

5. El antibiótico 16.511 R.P. contiene carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Su composición elemental es la siguiente:

C % = 65,8 H % = 7,8 O % = 22,75 N % = 3,55

Se caracteriza por las propiedades físicas siguientes:

10. Aspecto : polvo amorfo amarillo

Punto de fusión : 114°

Espectro ultravioleta

(a) determinación a partir de una solución de 10 mg/l en el metanol

15. un máximo de absorción a 232 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 682$

un mínimo de absorción a 260 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 130$

un máximo de absorción a 350 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 375$

Este espectro ^{se} representa en la figura 1.

(b) determinación a partir de una solución de 10 mg/l en la sosa 0,1N

20. un máximo de absorción a 231 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 691$

un mínimo de absorción a 266-286 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 145$

un máximo de absorción a 352 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 453$

Este espectro se representa en la figura 2.

25. Espectro infrarojo (determinación partiendo de comprimidos en mezcla con bromuro de potasio).

Este espectro se representa por la figura 3, en la que se han tomado en abscisas, por una parte las

337456



longitudes de ondas expresadas en micrones (escala inferior) y por otra parte los números de ondas en cm^{-1} (escala superior), y como ordenadas, las densidades ópticas.

- 5. En la Tabla I se indican las bandas principales de absorción infrarroja para este producto.

TABLA I.

	3400 tF	1410 m	910 m	
	3100 ép	1375 F	855 m	
10.	3010 f	1310 tf	845 tf	
	2960 F	1250 m	825 tf	
	2920 F	1230 m	805 f	
	2870 f	1185 m	780 f	tF = muy fuerte
	(hacia 1700) ép	1145 m	750 tf	F = fuerte
15.	1640 tF	1095 m	700 m	m = media
	1580 F	1070 m	680 f	f = débil
	1540 ép	1025 m	630 f	tf = muy débil
	1475 ép	990 m	600 f	ép = paro
	1455 m	965 m	550 f	
20.	1440 m	945 ép		

Poder rotatorio.

El 16.511 R.P. es ópticamente activo; los poderes rotativos son los siguientes:

- a) - en solución al 1% en el metanol

25.
$$\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{22} = -121 \pm 2^\circ$$

$$\left[\alpha \right]_{578}^{22} = -130 \pm 2^\circ$$

30.
$$\left[\alpha \right]_{546}^{22} = -156 \pm 2^\circ$$

337456



b) - en solución al 1% en la sosa N^o 2 MAC

$$[\alpha]_D^{22} = -134 \pm 4^{\circ}$$

La sal sódica del 16.511 R.P. tiene la composición elemental siguiente:

C % = 61,3 H % = 7,95 O % = 23,95 N % = 3,30 Na % = 3,75

Esta sustancia se caracteriza por las propiedades físicas siguientes:

Aspecto : Polvo amorfo amarillo.

Espectro ultravioleta - (determinación a partir de una solución de 10 mg/l en el metanol).

10.

Máximo de absorción a 232 nm	$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 550$
Mínimo de absorción a 261 nm	$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 90$
Máximo de absorción a 350 nm	$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 350$

15.

Este espectro se representa en la figura 4.

Espectro infrarojo - (determinación partiendo de comprimidos en mezcla con bromuro de potasio).

Este espectro se representa en la figura 5,

20.

cuyas coordenadas son idénticas a las de la figura 3.

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

337456



TABLA II.

	3410	tF	1330	m	940	ép
	3010	f	1270	ép	910	m
	2960	F	1250	m	855	m
5.	2920	m	1225	m	810	m
	2870	f	1190	m	745	ép
	1630	tF	1140	m	695	m
	1560	F	1090	ép	600	ép
	1485	m	1065	m	555	m
10.	1445	m	1020	m	465	m
	1415	m	990	m		
	1375	F	960	m		
	1350	ép				

tF = muy fuerte

15. F = fuerte

m = media

f = débil

ép = paro

Poder rotatorio.

20. En solución en metanol, el 16.511 R.P., sal sódica, tiene los poderes rotatorios siguientes:

$$\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{22} = -112 \pm 7^{\circ} \quad c = 0,1$$

25. $\left[\alpha \right]_{578}^{22} = -124 \pm 7,2^{\circ} \quad c = 0,1$

$$\left[\alpha \right]_{546}^{22} = -146 \pm 7,4^{\circ} \quad c = 0,1$$

$$\left[\alpha \right]_{436}^{22} = -390 \pm 19^{\circ} \quad c = 0,1$$

30. $\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{22} = -113,7 \pm 2,1^{\circ} \quad c = 0,6$

337456



Cromatografía en capa delgada del 16. R.P.

5. El 16.511 R.P. puede identificarse por cromatografía en capa delgada, según Stahl. El soporte de cromatografía es Kieselgel "H" que fluoresce a 254 y 336 nm. de Merck, amortiguado a un pH de 5 por un amortiguador fosfato M/15. El desarrollo se realiza en el sentido ascendente con acetato de etilo. El cromatograma se observa con luz de Wood o se revela por bioautografía en placa de gelosa nutritiva, se embarga con *Neisseria catarrhalis* o *Sarcina lutea*. Este cromatograma indica que el 16.511 R.P., contiene cuatro sustancias activas A, B, C y D, cuyas Rf son respectivamente de 0,1 - 0,2 - 0,35 y 0,60. El constituyente B que es el principal y que ha podido aislarse, se denomina 18.051 R.P.

Estos cuatro constituyentes pueden separarse partiendo de la mezcla que los contiene, por distintos métodos que se describirán más adelante.

20. El 18.051 R.P., en forma ácida, posee las mismas características de solubilidad que el 16.511 R.P., ácido. Su sal sódica es fácilmente soluble en el agua (superior a 10% peso/volumen) y los alcoholes, poco soluble en acetona y muy poco soluble en acetato de etilo y cloruro de metileno.

25. El 18.051 R.P., contiene carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Su composición elemental es la siguiente:

C% = 64,7 H% = 8,2 O% = 23,75 N% = 3,35

30. Se caracteriza por las propiedades físicas siguientes:

337456



Aspecto : polvo amorfo amarillo.

Punto de fusión : 112°.

Espectro ultravioleta :

5. a) - determinación a partir de una solución de 10 mg/l en el metanol:
- un máximo de absorción a 233 nm $E_{1cm}^{1\%} = 620$
 - un mínimo de absorción a 260 nm $E_{1cm}^{1\%} = 102$
 - un máximo de absorción a 350 nm $E_{1cm}^{1\%} = 360$

10. Este espectro se representa en la figura 6.

- b) - determinación a partir de una solución de 10 mg/l en la sosa N/10:
- un máximo de absorción a 234 nm $E_{1cm}^{1\%} = 660$
 - un mínimo de absorción a 263 nm $E_{1cm}^{1\%} = 153$
15. - un mínimo de absorción a 294 nm $E_{1cm}^{1\%} = 159$
- un máximo de absorción a 353 nm $E_{1cm}^{1\%} = 430$

Este espectro se representa en la figura 7.

Espectro infrarojo, (determinación a partir de comprimidos en mezcla con bromuro potásico).

20. Este espectro se representa por la figura 8; las coordenadas se expresan del mismo modo que las de la figura 3.

En la Tabla III se indican las principales bandas de absorción infraroja para este producto.

337456



2

TABLA III

	3405 F	1475 ép	1065 m	700 m
	3080 f	1460 m	1020 F	680 f
	3010 ép	1440 ép	985 F	645 f
5.	2960 F	1405 m	960 m	630 f
	2920 m	1370 F	940 ép	600 f
	2865 m	1305 f	900 m	580 f
	2810 ép	1275 ép	880 tf	550 f
	(hacia 1710)ép	1250 ép	860 m	
10.	1640 tF	1235 m	840 tf	
	1610 ép	1185 m	825 ép	
	1575 F	1160 tf	805 m	
	1560 f	1145 m	775 f	
	1535 F	1090 m	730 tf	

15. tF = muy fuerte
 F = fuerte
 m = media
 f = débil
 tf = muy débil
20. ép = paro

Poder rotatorio: En solución en metanol, el 18,051 R.P.,
 tiene los poderes rotatorios siguientes:

	$[\alpha]_D^{22}$	$= -116,5 \pm 5,5^{\circ}$	$c = 0,73$
25.	$[\alpha]_{578}^{22}$	$= -129 \pm 5,5^{\circ}$	$c = 0,73$
	$[\alpha]_{546}^{22}$	$= -153 \pm 6^{\circ}$	$c = 0,73$
30.	$[\alpha]_{436}^{22}$	$= -414 \pm 33^{\circ}$	$c = 0,104$

337456 - 10 -



Cromatografía en capa delgada:

En el sistema indicado para el 16.511 R.P., el 18.051 R.P., se caracteriza por un Rf de 0,2 y corresponde al constituyente B del 16.511 R.P.

5. La sal/sódica del 18.051 R.P., tiene la composición elemental siguiente:

C % = 62,0 H % = 7,9 O % = 23,25 N % = 3,3 Na % = 3,0

Se caracteriza por las propiedades físicas siguientes:

10. Aspecto : polvo amorfo amarillo.

Espectro ultravioleta (determinación a partir de una solución de 10 mg/l en el metanol).

- un máximo de absorción a 232 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 600$
- un mínimo de absorción a 261 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 105$
15. - un máximo de absorción a 353 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 380$

Este espectro se representa en la figura 9.

Espectro infrarrojo (determinación a partir de comprimidos en mezcla con el bromuro potásico).

20. Este espectro se representa en la figura 10 expresándose las coordenadas del mismo modo que las de la figura 3.

En la Tabla IV, indican las principales bandas de absorción infrarroja para este producto.

337456

- 11 -



TABLA IV.

	3390 tF	1450 m	1065 m	615 m
	3020 f	1415 m	1020 m	560 f
	2960 F	1375 F	990 m	
5.	2930 m	1350 f	960 m	
	2870 m	1330 f	945 ép	
	2820 ép	1300 tf	905 m	
	(hacia 1710) ép	1275 m	885 f	
	1630 tF	1250 m	855 m	
10.	1580 m	1230 m	840 tf	
	1560 f	1190 m	810 f	
	1545 m	1145 m	750 ép	
	1475 F	1095 m	700 m	

tF = muy fuerte

15. F = fuerte

m = media

f = débil

tf = muy débil

ép = paro

20. Poder rotatorio: En solución en el metanol, la sal
sódica del 18.051 R.P. tiene los
poderes rotatorios siguientes:

$$\left[\alpha \right]_D^{22} = -118 \pm 2^{\circ} \quad c = 1$$

25.
$$\left[\alpha \right]_D^{22} = -120 \pm 5^{\circ} \quad c = 0,12$$

30. La actividad bacteriostática del 16.511 R.P.
con respecto a un cierto número de gérmenes, se ha de-
terminado por uno de los métodos de dilución corriente-
mente empleados para este fin. Para cada germen, se ha

337456

- 12 -



- 2 MAR. 1967

determinado la menor concentración de substancia que, en condiciones definidas, impide todo desarrollo visible en un caldo nutritivo adecuado. Los resultados de las distintas determinaciones se reunen en la Tabla V en la que las concentraciones bacteriostáticas mínimas, se expresan en microgramos de substancia por cm^3 de medio de ensayo.

5.

TABLA V.

Organismos bacterianos ensayados	Concentraciones mínimas bacteriostáticas (en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$)
<i>Neisseria catarrhalis</i> (A 152 - Institut Pasteur)	0,4
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (A 50 - Institut Pasteur)	0,4
<i>Neisseria meningitidis</i> (5813 - Institut Pasteur)	0,1
<i>Diplococcus pneumoniae</i> (cepa Til, Institut Pasteur)	0,8
<i>Streptococcus pyogenes hemolyticus</i> (cepa Dig 7, Inst. Pasteur)	0,8
<i>Streptococcus faecalis</i> - ATCC 8043	2
<i>Sarcina lutea</i> - ATCC 9341	20
<i>Staphylococcus aureus</i> , cepa 209 P - ATCC 6538 P	> 100
<i>Staphylococcus aureus</i> , cepa Smith	> 100
<i>Bacillus subtilis</i> - ATCC 6633	> 100
<i>Mycobacterium species</i> - ATCC 607	100
<i>Escherichia coli</i> - ATCC 9637	60
<i>Salmonella dysenteriae</i> - Shiga L (Institut Pasteur)	> 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cepa Bass - Institut Pasteur)	> 100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - ATCC 10.031	30
<i>Pasteurella multocida</i> (A 125, Institut Pasteur)	> 100
<i>Brucella bronchiseptica</i> (CN 387 - Wellcome Instituto)	30
Tréponème de Reiter	0,15

337456



El 18.051 R.P., es activo sobre los mismos gérmenes y en las mismas concentraciones.

5. Estas distintas determinaciones indican que la actividad del 16.511 R.P. y del 18.051 R.P., se ejerce principalmente sobre los gérmenes del género Neisseria, así como sobre el Streptococo hemolítico y el Pneumococo. Los productos son igualmente activos sobre el treponema de Reiter. Sobre los estafilococos, las microbacterias y los bacilos Gram-negativos, los nuevos antibióticos ejercen poca o ninguna acción de inhibición.

10. La actividad antibacteriana del 16.511 R.P., se ha confirmado "in vivo" sobre animales de laboratorio infectados experimentalmente por gérmenes, tales como los meningococos y los estreptococos. Demuestra su actividad especial, por vía subcutánea. Por esta misma vía, el 18.051 R.P., tiene la misma actividad sobre la meningococia del ratón.

15. La toxicidad del 16.511 R.P., se ha estudiado principalmente en el ratón. La dosis letal 50%, o DL₅₀ se ha determinado por vía subcutánea.

DL₅₀ . 1,85 g/kg.

Este resultado indica que el producto es muy poco tóxico.

20. Los organismos productores del antibiótico 16.511 R.P., pertenecen al género Streptomyces.

25. Su aislamiento se ha realizado de acuerdo con el método general siguiente: una muestra de tierra se pone en suspensión en agua destilada estéril, y luego la suspensión se diluye a distintas concentraciones;

30.



337456

un pequeño volumen de cada dilución se distribuye en la superficie de cajas de Petri que contengan un medio nutritivo gelosado. Después de una incubación de algunos días a 26°C, las colonias de microorganismos que se quieran aislar se transplantan a gelosas inclinadas con objeto de obtener cultivos más abundantes.

5.

El "*Streptomyces hygroscopicus* var. *tepidalitus* DS 21.336" se ha aislado de un fragmento de tierra recogido en Francia, en Rungis, en la región parisiense. Se ha depositado en el N.R.R.L., de Peoria, Ill., Estados Unidos con la referencia NRRL 3237.

10.

Este organismo pertenece al género *Streptomyces* y, más precisamente constituye una variedad de la especie *S. hygroscopicus*, cuyas características esenciales se han definido por H.D. Tresner y E. J. Backus (*Applied Microbiology* 4, 243-250, 1956) y por S.A. Waksman (*The Actinomycetes*, II, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1961, pg. 230-231). Esta cepa productora de 16.511 R.P., tiene entre otras la particularidad de desarrollarse bien a 26°C, un poco peor a 30°C, y de ningún modo a 37°C; por esta razón se la ha llamado *Streptomyces hygroscopicus*, variedad *tepidalitus*.

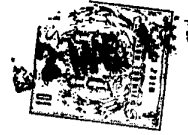
15.

20.

25.

30.

El *S. hygroscopicus*, var. *tepidalitus*, tiene las tres características de la especie *S. hygroscopicus* definida por H.D. Tresner y E.J. Backus y por S. A. Waksman: a) sus filamentos esporíferos se terminan en general en espirales de un arrollamiento de algunas vueltas, muy generalmente de 1 a 4, aunque se observan ocasionalmente espirales más largas que tienen un número de vueltas mayor; b) el aparato a ello esporulado



337456

- cuando llega a un buen estado de desarrollo, acusa un tinte gris oscuro correspondiente al acusado por la especie S.hygroscopicus; c) en determinados medios de cultivo que permiten una buena esporulación, aparición por envejecimiento en las zonas esporuladas, superficies negras, brillantes, húmedas, características de la especie S.hygroscopicus. En el S.hygroscopicus, var. tepidalitus, la transformación del tapiz esporífero gris obscuro en forma de revestimiento negro sigue de modo
5. rápido la llegada a la madurez de la esporulación; este carácter se observa especialmente en gelosa de Hickey y Tresner, gelosa avena-tomate de Pridham, gelosa con extracto de levadura de Pridham, gelosa con almidón de Grundy.
10. El S.hygroscopicus, var. tepidalitus, acusa en numerosos medios de cultivo gelosado, una esporulación nula o pobre y poco abundante, sin embargo, ésta en general, está mejorada en presencia de tierra.
15. H.D. Tresner y E.J. Backus indican la producción de pigmento vinoso en determinadas condiciones, por numerosas cepas de la especie S.hygroscopicus. Esta producción se ha encontrado nuevamente con la cepa productora de 16.511 R.P., en especial sobre gelosa sintética de Gause, sobre gelosa al malato de calcio y
20. sobre gelosa con almidón de Pridham.
25. De acuerdo con los diversos medios donde se ha observado, el S.hygroscopicus var. tepidalitus produce pigmentos solubles que van del amarillo al pardo, en la gama de los pigmentos solubles producidos por
30. las cepas pertenecientes a la especie S.hygroscopicus;

337456



debe observarse, sin embargo, que produce en ciertos casos pigmentos solubles bastante oscuros, más oscuros a veces que la mayor parte de las variedades de S.hygroscopicus citadas.

5. Además, contrariamente a la descripción de S.hygroscopicus que figura en *The Actinomycetes* (Selman A Waksman), el S.hygroscopicus var. tepidalitus, proporciona un pigmento soluble amarillo pardo en gelatina, no provoca la acidificación de la leche, y produce sulfhídrico de modo abundante. Sus esporas no son ovaladas, sino cilíndricas cortas o isodiamétricas con extremos truncados.
10. Sin embargo, las diferencias apreciadas entre el microorganismo productor de 16.511 R.P., y la especie S.hygroscopicus descrita por H.D. Tresner y E.J. Backus, no son suficientemente importantes para permitir considerar que este organismo constituya una especie diferente de la especie S.hygroscopicus, de la que presenta las principales características.
15. El S.hygroscopicus var. tepidalitus, forma filamentos esporíferos que, en su mayor parte, terminan arrollándose en espirales que tienen en general de una a cuatro vueltas, aunque ocasionalmente se observan espirales de mayor número de vueltas o, esporádicamente también, filamentos esporíferos sencillamente recurvados en su parte terminal, sin formar una vuelta completa, o también a veces espirales más o menos flojas y desarrolladas. Estos filamentos esporíferos se insertan sobre unos filamentos de base, bien aisladamente o bien reunidos
20. varios en el extremo de un primer filamento que forma un
- 25.
- 30.



337456

- ramillete terminal, o también reunidos varios en un mismo filamento formando un racimo. Las esporas son cilindros cortos, o células isodiamétricas con extremos truncados, y miden de 0,4 a 0,6 μ /0,6 a 0,8 μ ;
5. cuando el filamento esporífero se rompe por envejecimiento, se liberan bien aisladamente, o bien reunidas en grupos de varias, esporas que conservan la forma de fragmento de círculo que describían en el filamento no llegado a la madurez. Exámenes microscópicos han demostrado una organización idéntica del aparato esporífero en gelosa avena-tomate de Pridham y gelosa al almidón de Pridham.
- 10.

- Los caracteres de cultivo y las propiedades bioquímicas propias del S. hygroscopicus var. tepidalitus
15. se han examinado en las gelosas nutritivas y en los caldos nutritivos corrientemente utilizados para examinar el aspecto de las cepas de Streptomyces, los cultivos en medios gelosados se realizan en gelosas inclinadas. Las observaciones se reúnen en la Tabla VI siguiente. Salvo indicaciones precisas, se refieren a cultivos de 2 a 3 semanas a 26°C, llegados a un buen estado de desarrollo. Un gran número de medios de cultivo empleados, se han preparado de acuerdo con las fórmulas que figuran en "The Actinomycetes", S.A. Waksman p.193-197, Chronica Botánica Co., Waltham, Mass. E.U.A., 1950 (en este caso se indican por la letra W seguida del número que se les ha atribuído en "The Actinomycetes"). Las referencias o constituciones de los demás medios de cultivo, son como sigue:
20. Ref. A - K.L. JONES - Journal of Bacteriology, 57,
25. 142. 1949.
- 30.



337456

- Ref. B - "Hickey and Tresner's Agar" - T.G. PRIDHAM
et. col. - Antibiotics Annual, 1956-1957,
pag. 947-953.
5. Ref. C - "Yeast Extract Agar" - T.G. PRIDHAM et col. -
Antibiotics Annual, 1956-1957, pag. 947-953.
- Ref. D - "Tomato Paste Oatmeal Agar" - T.G. PRIDHAM et
col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, pag.
947-953.
10. Ref. E - GRUNDY et col. - Antibiotics and Chem., 2,
401 (1952).
- Ref. F - Peptone 0,5% - Extracto de carne 0,3 % -
Tyrosina 0,5 % - Gelosa 2 %.
15. Ref. G - "Inorganic Salts - Starch Agar" - T.G. PRIDHAM
et col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, pag.
947-953.
- Ref. H - GRUNDY et col. - Antibiotics and Chem. 1,
310, (1951).
20. Ref. I - GAUSE et col. - Zur Klassifizierung der Acti-
nomycetes - Veb Gustav Fisher Verlag, Jena,
1958 - pag. 14.
- Ref. J - corresponde a la fórmula W1, en la que 30 g de
sacarosa se substituyen por 15 g de glicerina.
25. Ref. K - "Plain gelatin" - preparada según las indica-
ciones del "Manual of Methods for Pure Culture
Study of Bacteria" - Society of American Bac-
teriologists, Geneva, N.Y. - II₅₀ - 18.
- Ref. L - Manual of Methods for Pure Culture Study of
Bacteria - Society of American Bacteriologists,
Geneva, N.Y. - II₅₀ - 18.



337456

- Ref. M - Corresponde a la fórmula W-18, pero substituyendo el 3% de sacarosa por 1,5% de glucosa.
- Ref. N - Corresponde a la fórmula W-18 en la que la sacarosa se suprime y se substituye por pequeñas tiras de papel de filtro parcialmente sumergidas en el líquido.
5. Ref. O - Medio indicado para la búsqueda de la producción de H₂S por: H.D. TRESNER et F. DANGA - Journal of Bacteriology, 76, 239-244 (1958).
10. Ref. P - Leche descremada, en polvo, comercial, reconstituída según las indicaciones del fabricante.
- Siguiendo el principio del método de Pridham (Journal of Bacteriology, 56, 107-114, 1948), el S. hygroscopicus, var. tepidalitus DS 21.336 utiliza medianamente, o bien, como orígenes de carbono, los elementos siguientes: arabinosa, glucosa, lebulosa, manosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, dextrina, almidón, glicógeno, glicerina. No se utilizan, o permiten solo un
15. desarrollo pobre y poco significativo; xilosa, rhamnosa, galactosa, sorbosa, lactosa, rafinosa, inulina, eritrita, adonita, dulcita, manita, sorbita, inosita.
20. La apreciación de los orígenes de nitrógeno que puede utilizar el S. hygroscopicus var. tepidalitus para asegurar su desarrollo, se ha realizado siguiendo el principio de este mismo método de Pridham, utilizando la glucosa, como origen de carbono en todos los casos y substituyendo el sulfato amónico del medio de base por distintos compuestos nitrogenados. En estas
25. condiciones, el S. hygroscopicus, var. tepidalitus,
- 30.

337456



- utiliza medianamente o bien, los compuestos siguientes: $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$, NO_3Na , adenosina, urea, dl-asparagina, glicocola, dl-alanina, dl-valina, ácido dl-aspartico, ácido l(+) glutámico, l(+) arginina, l(+) lisina, dl-serina, dl-treonina, l(-) tirosina, dl-prolina, l(-) hidroxiprolina, l(-) histidina; la dl-fenilalamina y el l-triptofano se utilizan también, pero un poco más tardíamente. No se utilizan NO_2Na , uracilo, acetamida, succinamida, creatina, creatinina, succinimida, sarcosina, taurina, betaina.
- 5.
- 10.



337456

TABLA VI.

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo o revés del cultivo	Aparato aéreo (con prendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la es población.)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Gelosa de Bennett (Ref.A)	Medio	Amarillo - Bastante bueno	Tardío - Blancuzco a grisáceo - Trazas	Amarillo	
Gelosa de Emerson (W 23)	Bastante bueno	Amarillo - pardo - Bastante bueno	Nulo	Amarillo pardo claro	
Gelosa de Hickey y Tressner (Ref.B)	Bueno	Revés pardo negro	Gris a negro, luego toma el aspecto negro céreo característico de los "higroscopicus"	Pardo muy obscuro	
Gelosa al extracto de levadura de Pridham (Ref.C)	Bueno	Amarillo grisáceo claro a gris parduzco. Bueno	Muy moderado gris a negro y luego presenta el aspecto negro céreo característico de los "higroscopicus"	Pardo amarillo	
Gelosa avena-tomate de Pridham (Ref. D)	Bueno	Gris amarillo parduzco a pardo amarillo. Muy bueno.	Muy moderado. Grisáceo claro a gris negro y luego adopta el aspecto negro céreo característico de los "higroscopicus"	Pardo amarillo ligeramente anaranjado	
Gelosa glucosa-pectona (W 6)	Medio	Pardo anaranjado. Medio	Tardío - Muy moderador. Grisáceo que se transforma en negro céreo	Pardo anaranjado	
Gelosa nutritiva (W 5)	Bastante bueno.	Amarillo pardo grisáceo Bastante bueno.	Nulo	Pardo amarillo claro.	
Gelosa glucosa-asparagina (W2)	Moderado	Amarillo. Medio	Nulo	Amarillo	
Gelosa glicerina asparagina (W3)	Bastante bueno	Amarillo Bastante	Tardío. Trazas. Negro	Amarillo	

337456



Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo o revés del cultivo	Aparato aéreo (comprendiendo el con junto del micelio aéreo y de la es-porulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bio-químicas
Gelosa al malato de calcio de Krainsky (Ref. E)	Muy pobre	Pobre. Incoloro a amarillo parduzco	Nulo, o gris a negro céreo, en estado de trazas	Rosa, vino pálido	Buena solubilización del malato de calcio
Gelosa a la tirosina (Ref. F)	Bueno	Pardo obscuro. Bueno	Nulo	Pardo amarillo obscuro	Solubilización de la tirosina moderada pero positiva.
Gelosa al almidón (W 10)	Bastante bueno	Pardo anaranjado a pardo rosado. Bastante bueno.	Nulo o trazas negruzco	Pardo rosado vinoso	Hidrólisis del almidón: moderada, pero positiva.
Gelosa al almidón de Pridham (Ref. G)	Bastante bueno	Amarillo grisáceo claro. Bueno	Nulo o gris a negruzco, al estado de trazas	Amarillo grisáceo muy débil	Hidrólisis del almidón: positiva
Gelosa al almidón de Grundy (Ref. H)	Moderado	Gris amarillento poco intenso. Moderado.	Muy moderado. Blancuzco que se transforma en gris a negro céreo por envejecimiento.	Nulo	
Gelosa sintética almidón-nitrato de Gause (Ref. I)	Bastante bueno	Pardo amarillo grisáceo claro a pardo rosado claro. Bueno	Blanco grisáceo a gris, que se transforma en negro céreo por envejecimiento. Muy pobre	Pardo rosado vino claro	
Gelosa sintética de Czapek a la sacarosa (W 1)	Bueno	Pardo amarillo grisáceo. Muy bueno	Nulo o ligeras trazas, blanco grisáceo.	Pardo amarillo a pardo anaranjado	

337⁻²³⁻456

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo o reveses del cultivo	Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Gelosa sintética de Czapek a la glicerina (Ref. J)	Buena	Pardo amarillo a pardo anaranjado. Buena	Nulo	Pardo anaranjado	
Cultivo en patata (W 27)	Buena	Pardo amarillo. Muy desarrollado, muy rizado.	Nulo	Pardo amarillo obscuro que se difunde en la patata	
Gelatina pura al 12 % (Ref. K)	Buena	Velo bien desarrollado que se sumerge en seguida al fondo de la zona de licuación. Micelio vegetativo pardo amarillo	Nulo	Pardo amarillo	Licuación bastante buena
Caldo nutritivo nitrado (Ref. L)	Modera-do	Anillo delgado blancuzco que vira a amarillento o parduzco después de un mes de cultivo	Nulo	Amarillo pardo claro	Reacción de los nitritos negativa durante ensayos realizados respectivamente después de 24, 48 horas, 8 días y 1 mes de cultivo.
Caldo almidón nitrado (W 19)	Modera-do	M.V. blanco-grisáceo a amarillo pardo	Nulo	Amarillo que vira a pardo amarillo en 1 mes	Reacción de los nitritos débilmente positiva al principio de los cultivos que inmediatamente se transforman con rapidez en negativa.

337456



Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo o revers del cultivo	Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Caldo de Czapek a la glucosa. (Ref. M)	Bastante bueno	Anillo medianamente desarrollado, blancuzco que vira a amarillo por envejecimiento.	Nulo	Amarillo	Reacción de los nitritos: débilmente positiva al principio de los cultivos, negativa enseguida.
Caldo de Czapek a la celulosa. (Ref. N)	Sin desarrollo				Utilización de la celulosa: negativa.
Pectona hierro agar Difco (Ref. O)	Bueno	Negro	Nulo	Negro. Abundante	Producción de H ₂ S : fuertemente positiva.
Leche descremada (Ref. P)	Bueno	Anillo amarillo	Nulo		Sin coagulación. Pectonización empezando al cabo de 15 días de cultivo; total en un mes; el pH pasa de 6,7 a 7,2 en un mes.

337456



El *Streptomyces lavendulae* 22.097 se ha aislado de una muestra de tierra obtenida en Francia, en Montevrain (S. y M.) y el *Streptomyces lavendulae* 22.408 se ha aislado de una muestra de tierra procedente de Inglaterra, región de Norhampton. Se han depositado en el N.R.R.L de Peoria, de. EE.UU. con las referencias NRRL 3277 y NRRL 3278 respectivamente.

Estas dos cepas tienen ambos caracteres morfológicos que demuestran su pertenencia a la especie *Streptomyces lavendulae*, por esta razón se les ha denominado respectivamente, *S. lavendulae* 22.097 y *S. lavendulae* 22.408.

El conjunto de los caracteres esenciales que presentan, está de acuerdo con los del *S. lavendulae* descritos por una parte en "The Actinomycetes" Volumen II (S.A. Waksman, The Williams and Wilking Co., Baltimore, 1961); págs.234-235; y por otra parte en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (séptima edición, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1957) pág. 780.

La diferencia más notable que existe entre estas nuevas cepas y la especie tipo descrita en las obras mencionadas, es que esta última tiene un desarrollo óptimo a 37°C mientras que a esta temperatura las nuevas cepas tienen un desarrollo casi nulo.

Los caracteres siguientes permiten por el contrario, incluirlas en las variedades de la especie *S. lavendulae*: producción de pigmento melánico negro en medio adecuado a la tirosina, así como producción de pigmento soluble pardo en la mayor parte de los medios orgánicos, color gris-rosa lavanda característico del micelio

337456



337.456

2 MAR 1956

aéreo esporulado, organización del aparato esporífero que acusa un cierto polimorfismo y produce, junto a filamentos portadores de esporas rectos o ligeramente flexuoso, filamentos portadores de esporas que se curvan en su extremo o se arrollan formando espirales cortas de gran diámetro (hasta 7-8 μ). Las dos nuevas cepas forman esporas ovaladas a cilíndricas de extremos redondeados que miden alrededor de 0,6-0,8 μ /1,0-1,2 μ .

5.

10.

15.

En la Tabla VII siguiente, se indican los caracteres morfológicos de las dos cepas *S. lavendulae* 22.097 y *S. lavendulae* 22.408, que presentan caracteres muy próximos. La diferencia más importante hasta ahora comprobada entre ellas, consiste en su capacidad de utilización de ciertos orígenes de carbono; la cepa *S. lavendulae* 22.408 utiliza la xilona y la arabinosa que no utiliza la cepa *S. lavendulae* 22.097.

20.

25.

30.

Los caracteres de cultivo y las propiedades bioquímicas de las dos nuevas cepas se han examinado en medios nutritivos corrientemente utilizados para examinar el aspecto de las cepas de streptomyces; los cultivos en medios gelosados se llevan a cabo en gelosas inclinadas. Las observaciones figuran en la Tabla VII siguiente; salvo indicaciones precisas se refieren a cultivos de 3 a 4 semanas a 26°C, llegados a un buen estado de desarrollo. Un cierto número de los medios de cultivo empleados, se han preparado de acuerdo con las fórmulas indicadas en "The Actinomycetes", S. A. Waksman, pág. 193-197, Chronica Botánica Co. Waltham, Mass: E.U.A., 1950; en este caso se indican por la letra W seguida del número que se les ha asignado en



337456

"The Actinomycetes". Las referencias o constituciones de los demás medios de cultivo, son las siguientes:

- Ref. A - K.L. JONES - Journal of Bacteriology, 57, 142, 1949.
- 5. Ref. B - Fórmula W 23 con adición de 2% de gelosa.
- Ref. C - "Hickey and Tresner's Agar" - T.G. PRIDHAM et col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, pág. 947-953.
- Ref. D - "Yeast Extract Agar". T.G. PRIDHAM et col. -
- 10. Antibiotics Annual, 1956-1957, pag. 947-953.
- Ref. E - W.E. GRUNDY et col. - Antibiotics and Chem. 2, 400, 1952.
- Ref. F - The Actinomycetes, vol. 2, pag. 333 - nº 42 - S.A. WAKSMAN - The Williams and Wilkins Co.,
- 15. Baltimore, 1961.
- Ref. G - Peptone 0,5% - Extracto de carne 0,3% - Tirosina 0,5% - Gelosa 2%.
- Ref. H - W.E.GRUNDY et col.- Antibiotics and Chem. 2, 401, 1952.
- 20. Ref. I - "Inorganic Salts-Starch Agar" - T.G. PRIDHAM et col., Antibiotics Annual, 1956-1957, pag. 947-953.
- Ref. J - Corresponde a la fórmula W 1 en la que 30 g de sacarosa se substituyen por 15 g de glucosa.
- 25. Ref. K - Corresponde a la fórmula W 1 en la que 30 g de sacarosa se substituyen por 15 g. de glicerina.
- Ref. L - "Plain gelatin" - preparada según las indicaciones del "Manual of Methods for Pure
- 30. Culture Study of Bacteria" de la Society of

337456



American Bacteriologists, Geneva, N.Y. -

II₅₀-18.

5. Ref. M - corresponde a la fórmula W 18 en la que la sacarosa se suprime y se substituye por pequeñas tiras de papel de filtro parcialmente sumergidas en el líquido.

10. Ref. N - Medio indicado para la investigación de la producción de H₂S por : H.D. TRESNER et F. DANGA - Journal of Bacteriology, 76, 239-244, 1958.

Ref. O - T.G. PRIDHAM et D. GOTTLIEB - Journal of Bacteriology, 56, 107-114, 1948.

TABLA VII

337456

Medios y caracteres		S.lavendulae 22.097	S.lavendulae 22.408
Modo de es- porulación	Esporóforos	Rectos o flexuosos o curvados en su extremo o también arrollados en espirales cortas de gran diámetro	Rectos o flexuosos o curvados en su extremo o también arrollados en espirales cortas de gran diámetro
	Esporas	Ovaladas a cilíndricas, midiendo de 0,6-0,8 μ /1 a 1,2 μ	Ovaladas a cilíndricas, midiendo de 0,6-0,8 μ /1 a 1,2 μ
Gelosa de Bennett (Ref. A)	Desarrollo	Bastante bueno	Bueno
	Revés	Pardo amarillo	Pardo amarillo a negruzco
	Aparato aéreo	Gris claro ligeramente rosado	Gris rosa lavanda
	Pigmento soluble	Pardo amarillo débil	Pardo amarillo
Gelosa de Emerson (Ref. B)	Desarrollo	Bastante bueno	Bastante bueno
	Micelio vegetativo	Pardo amarillo grisáceo claro	Pardo amarillo
	Aparato aéreo	Nulo o grisáceo, al estado de trazas,	Gris rosa lavanda. Moderadamente desarrollado.
	Pigmento soluble	Pardo amarillo débil	Pardo amarillo
Gelosa de Hickey y Tressner (Ref. C)	Desarrollo	Bueno	Muy bueno
	Revés	Pardo negro	Pardo amarillo obscuro a negruzco
	Aparato aéreo	Gris rosa	Gris rosa lavanda
	Pigmento soluble	Pardo amarillo obscuro que va hacia pardo negruzco	Pardo amarillo muy obscuro que va hacia pardo negruzco
Gelosa al extracto de levadura de Pridham (Ref. D)	Desarrollo	Bueno	Bueno
	Revés	Pardo obscuro	Pardo amarillo
	Aparato aéreo	Gris rosa lavanda	Gris rosa lavanda
	Pigmento soluble	Pardo negruzco	Pardo amarillo grisáceo
Gelosa a la avena de Carvajal (Ref. E)	Desarrollo	Bueno	Bueno
	Revés	Pardo amarillo	Pardo amarillo
	Aparato aéreo	Gris rosa	Gris rosa
	Pigmento soluble	Pardo grisáceo	Gris pardo débil

337456



Medios y caracteres		S. lavendulae 22.097	S.lavendulae 22.408
Gelosa glucosa- peptona (W. 7)	Desarrollo Micelio vege- tativo Aparato aéreo Pigmento so- luble	Bastante bueno Pardo amarillo gri- sáceo Nulo Pardo grisáceo	Moderado Amarillento claro Nulo o gris rosado en estado de trazas Amarillento
Gelosa nutritiva (W. 5)	Desarrollo Micelio vege- tativo Aparato aéreo Pigmento so- luble	Medio Pardo amarillo Nulo Pardo amarillo	Moderado Gris parduzco claro Nulo Parduzco poco intenso
Gelosa tirosina- extracto de leva- dura para formación de mel- nina (Ref. F)	Desarrollo Revés Aparato aéreo Pigmento solu- ble Formación de melanina	Bastante bueno Pardo obscuro a negro Nulo o grisáceo, al estado de trazas Negro Fuertemente positivo a los 4 días de cul- tivo	Bastante bueno Pardo muy obscuro Grisáceo. Muy mode- radamente desarro- llado Pardo negro Positivo, a los 4 días de cultivo
Gelosa a la tiro- sina (Ref. G)	Desarrollo Micelio vege- tativo Aparato aéreo Pigmento soluble Solubilización de la tirosina	Medio Pardo obscuro Blanco-grisáceo. Pobre Pardo amarillo obs- curo Bastante buena	Moderado Pardo obscuro Grisáceo claro. Moderado Pardo amarillo obs- curo Débil
Gelosa al malato de calcio de Krainsky (Ref. H)	Desarrollo Revés Aparato aéreo Pigmento soluble Solubilización del malato	Moderado Amarillento claro Blanco grisáceo a gris rosado Amarillo grisáceo débil Positiva	Moderado Amarillento claro Blancuzco a gris rosado Amarillo grisáceo claro Positiva
Gelosa glucosa- aspara- gina (W 2)	Desarrollo Micelio vege- tativo Aparato aéreo Pigmento soluble	Muy moderado Amarillo grisáceo claro Nulo Nulo	Pobre Amarillento claro Nulo Nulo

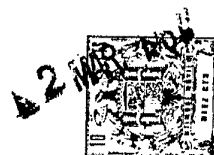
337456⁻³¹ -

Medios y caracteres		S.lavendulae 22.097	S.lavendulae 22.408
Gelosa glicerina-asparagina (W 3)	Desarrollo	Bueno	Bueno
	Revés	Amarillo pardo a pardo amarillo claro	-Amarillo pardo claro
	Aparato aéreo	Blancuzco a gris rosado	Gris rosa lavanda
	Pigmento soluble	Pardo amarillo débil	Pardo amarillo débil
Gelosa almidón de Pridham (Ref. I)	Desarrollo	Bueno	Bueno
	Revés	Amarillo	Amarillo parduzco
	Aparato aéreo	Gris rosa lavanda	Gris rosa lavanda
	Pigmento soluble	Gris amarillento muy débil	Gris parduzco débil
	Hidrólisis del almidón	Positiva. Buena	Positiva. Buena.
Gelosa sintética de Czapek a la sacarosa (W 1)	Desarrollo	Pobre	Pobre
	Revés	Incoloro a amarillo	Amarillento muy claro
	Aparato aéreo	Blanco grisáceo al estado de trazas	Grisáceo a gris rosa claro; al estado de trazas.
	Pigmento soluble	Nulo	Nulo
Gelosa sintética de Czapek a la glucosa (Ref. J)	Desarrollo	Bastante bueno	Bastante bueno
	Revés	Pardo amarillo claro	Pardo amarillo claro
	Aparato aéreo	Nulo	Grisáceo a gris rosado. Moderadamente desarrollado
	Pigmento soluble	Pardo amarillo claro	Pardo amarillo claro
Gelosa sintética de Czapek a la glicerina (Ref. K)	Desarrollo	Bueno	Bueno
	Micelio vegetativo	Amarillo, espeso y rizado, bien desarrollado	Amarillo, espeso y rizado, bien desarrollado
	Aparato aéreo	Nulo	Blancuzco a grisáceo; muy moderadamente desarrollado
	Pigmento soluble	Pardo amarillo claro	Amarillo parduzco claro
Cultivo en patata (W 27)	Desarrollo	Bueno	Muy bueno
	Micelio vegetativo	Espeso y rizado. Pardo amarillo obscuro	Espeso y rizado
	Aparato aéreo	Nulo o grisáceo al estado de trazas	Grisáceo a gris rosa lavanda
	Pigmento soluble	Pardo obscuro a negruzco	Negruzco en pequeña cantidad

337456



Medios y caracteres		S.lavendulae 22.097	S.lavendulae 22.408
Gelatina pura al 12% (Ref. L)	Desarrollo	Bueno	Bueno
	Micelio ve- getativo	Desarrollo en su- perficie gris par- duzca a pardo amarillo	Desarrollo en super- ficie gris parduzca a amarillento pardo
	Aparato aéreo	Nulo	Grisáceo en estado de trazas
	Pigmento so- luble	Pardo amarillo	Pardo amarillo
	Licuación de la gelatina	Buena	Buena
Caldo al- midón-ni- trato (W 19)	Desarrollo	Bastante bueno	Bueno
	Micelio vege- tativo	Velo amarillo gri- sáceo claro	Velo bien desarrolla- do; revés amarillo.
	Aparato aéreo	Nulo	Blancuzco en estado de trazas
	Pigmento so- luble	Amarillo	Amarillo
	Reducción de los nitratos a nitritos	Positiva	Positiva
Caldo de Czapek a la celu- losa (Ref. M)	Desarrollo	Nulo	Nulo
	Utilización de la celu- losa.	Negativa	Negativa
Pectona hierro agar Difco (Ref. N)	Desarrollo	Bueno	Bueno
	Micelio vege- tativo	Negro	Pardo obscuro
	Aparato aéreo	Nulo	Nulo
	Pigmento so- luble	Negro intenso	Negro intenso
	Producción de H ₂ S	Positiva desde las 24 horas de cultivo	Positiva desde las 24 horas de cultivo



Medios y caracteres S.lavendulae 22.097 S.lavendulae 22.408

Utilización de orígenes de carbono, según el método de Pridham y Gottlieb

337456

(Ref. 0)

xilosa	negativo	positivo
arabinosa	negativo	positivo
rhamnosa	negativo	negativo
glucosa	positivo	positivo
galactosa	negativo	negativo
levulosa	negativo	negativo
mannosa	positivo	positivo
lactosa	negativo	negativo
maltosa	positivo	positivo
saccharosa	negativo	negativo
trehalosa	-positivo	positivo
cellobiosa	positivo	positivo
raffinosa	negativo	negativo
dextrina	positivo	positivo
inulina	negativo	negativo
almidón	positivo	positivo
glicogeno	positivo	positivo
glicerina	positivo	positivo
erithrita	negativo	negativo
adonita	negativo	negativo
dulcita	negativo	negativo
manita	negativo	negativo
sorbita	negativo	negativo

- 34 -
337456



- El procedimiento de preparación del antibiótico 16.511 R.P. consiste esencialmente en cultivar *Streptomyces hygrosopicus* var. *tepidalitus* DS 21336, *Streptomyces lavendulae* 22.097, *Streptomyces lavendulae* 22408 o sus mutaciones en un medio y en condiciones adecuadas, y en separar a continuación el antibiótico formado durante el cultivo.
- 5.

- El cultivo de estos *Streptomyces* puede llevarse a cabo por cualquier método de cultivo aerobio en superficie o en profundidad, pero es preferible este último por razones de comodidad. Se utilizan para este objeto los distintos tipos de aparatos que son ahora de uso corriente en la industria de las fermentaciones.
- 10.

15. En especial puede adoptarse la marcha siguiente para realizar las operaciones:

Streptomyces hygrosopicus var. *tepidalitus* }
o *Streptomyces lavendulae* 22.097 o 22.408 } reserva

20. ↓
cultivo en gelosa
↓
cultivo en ampolleta agitada
↓
cultivo inocular en fermentador
↓
cultivo de producción en fermentador

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

30. Como origen de carbono asimilable, pueden



337456

- utilizarse hidratos de carbono, tales como la glucosa, las dextrinas, el almidón, la sacarosa o las melazas *S.hygroscopicus*, u otras sustancias hidrocarbonadas como los azúcares, alcoholes, glicerol, ... o como determinados ácidos orgánicos: ácidos láctico, cítrico, tártrico, ... Algunos aceites animales o vegetales, como el aceite de manteca o el aceite de soja, pueden reemplazar ventajosamente estos distintos orígenes hidrocarbonados o usarse con ellos.
- 5.
10. Los orígenes convenientes de nitrógeno asimilable, son extremadamente variados. Pueden ser sustancias químicas muy sencillas como los nitratos, las sales minerales y orgánicas de amonio, la urea, los ácidos aminados, etc. Pueden introducirse también mediante sustancias complejas que contengan especialmente el nitrógeno en forma protídica: caseína, lactalbúmina, gluten y sus hidrolizados, harinas de soja, de cacahuete, de pescado, extractos de carne, de levadura, distillers' soluble, "corn-steep".
- 15.
20. Entre los elementos minerales añadidos, algunos pueden tener un efecto amortiguador con el neutralizador, como los fosfatos alcalinos o alcalino-térreos, o los carbonatos de calcio y de magnesio.
- Otros introducen el equilibrio iónico necesario para el desarrollo del *Streptomyces* y para la elaboración del antibiótico, tales como los cloruros y sulfatos de los metales alcalinos y alcalino-térreos. Finalmente, algunos actúan de modo más especial como activadores de las reacciones metabólicas del *Streptomyces*: son las sales de cinc, de cobalto, de hierro,
- 25.
- 30.



337456

de cobre y de manganeso.

- El pH del medio de fermentación al iniciarse el cultivo ha de estar comprendido entre 6,0 y 7,8 siendo con preferencia de 6,5 a 7,5. La temperatura óptima para la fermentación es de 25-28°C, pero una producción satisfactoria puede obtenerse para temperaturas comprendidas entre 23 y 35°C. La aireación de la fermentación puede variar entre valores bastante elevados. Se ha comprobado, sin embargo, que las aireaciones de 0,2 a 2 litros de aire por litro de caldo y por minuto, convienen de modo especial. El rendimiento máximo en antibiótico, se obtiene después de 3 a 7 días de cultivo; este tiempo depende esencialmente del medio utilizado.
5. De acuerdo con los párrafos anteriores, se comprende que las condiciones generales del cultivo de *Streptomyces hygroscopicus* var. *tepidalitus* o *Streptomyces lavendulae* 22.097 o 22.408 para la producción del antibiótico 16511 R.P. pueden variar en grado bastante elevado y adaptarse a cada una de las necesidades especiales.
10. El antibiótico 16.511 R.P., puede aislarse de los mostos de fermentación, por distintos métodos.
15. El antibiótico 16.511 R.P., puede extraerse directamente de los mostos de fermentación, por alcoholes alifáticos que tengan por lo menos, 3 átomos de carbono, por el acetato de etilo, por los disolventes clorados en especial el cloruro de metileno de un pH comprendido entre 2 y 9. Puede también filtrarse el mosto de fermentación a un pH superior a 6 y con pre-
- 20.
- 25.
- 30.

337456

- 37 -



- ferencia próximo a 9,5, y extraer del filtrado el antibiótico por empleo de un disolvente no miscible con el agua, tal como un alcohol alifático que tenga por lo menos, 3 átomos de carbono, acetato de etilo o de amilo, metilisobutilcetona, los disolventes clorados, por ejemplo, cloroformo, dicloroetano o, más especialmente, cloruro de metileno. El antibiótico en solución en el filtrado, puede adsorberse en resina cambiadora de iones de naturaleza aniónica enérgica y luego elucionarse por una solución hidroalcohólica, que contenga un electrólito, tal como el ácido clorhídrico o los cloruros de sodio, amonio, potasio, calcio o magnesio, a razón de 5 a 50 g/litro de eluyente. Obtenido el producto de elución, se concentra a presión reducida y luego se extrae por un disolvente no miscible con el agua.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.
- El antibiótico bruto, puede aislarse partiendo de las soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas antes indicadas, por concentración de la solución a presión reducida, seguida por una precipitación por un no-disolvente o un mal disolvente, tal como un hidrocarburo alifático de 6 a 8 átomos de carbono, ciclohexano, o éter etílico.
- A continuación el 16.511 R.P. puede purificarse por uno de los métodos siguientes: disolución selectiva en disolventes, tales como el acetato de etilo o el cloruro de metileno, seguida por una filtración; tratamiento de las soluciones del antibiótico bruto en el acetato de etilo, alcoholes líquidos de por lo menos 3 átomos de carbono, disolventes clo-

337456 - 38 -



2 MAR

5. rados o su mezcla con negro activado, seguido por una filtración; cromatografía de una solución del antibiótico en un alcohol, una cetona, un disolvente clorado o el acetato de etilo sobre un adsorbente, tal como la alúmina, el gel de sílice o el florisil, seguida de una elución por el mismo disolvente; fijación en resina cambiadora de iones de naturaleza aniónica enérgica, de una solución del antibiótico en agua de pH 9 seguida por una elución mediante una
10. mezcla metanol-agua (80:20 en volumen) que contenga 1% en peso de cloruro sódico; disolución del antibiótico en agua de pH 9 y luego extracción de la solución acuosa a un pH comprendido entre 3 y 9 por un disolvente inmiscible con el agua, tal como el acetato de etilo o el cloruro de metileno.
15. Es comprensible que los distintos métodos indicados pueden aplicarse sucesivamente en un orden cualquiera o repetirse varias veces, de acuerdo con los imperativos de la fabricación, para obtener el
20. 16.511 R.P. en forma conveniente para las aplicaciones previstas.
25. El 18.051 R.P., puede obtenerse partiendo del 16.511 R.P. por métodos clásicos de separación:
- Extracción selectiva por disolventes adecuados; puede emplearse especialmente la mezcla cloruro de metileno-tampón de fosfato de pH 9, o también la mezcla cloruro de metileno-ciclohexano-tampón de fosfato de pH 9, M/15 (80:20:100 en volumen).
 - Cromatografía de una solución de 16.511 R.P., sobre
30. distintos adsorbentes: se utilizan con preferencia



337456

geles de sílice impregnados de soluciones amortiguadoras de concentraciones diversas y de pH comprendidos entre 3 y 9 (y con preferencia entre 4 y 6). El 16.511 R.P. puede fijarse sobre el adsorbente, bien

- 5. mezclando íntimamente éste y una solución metanólica del antibiótico, para obtener una papilla que se seca inmediatamente, o bien haciendo pasar a la columna una solución del antibiótico en un disolvente, tal como el acetato de etilo. El cromatograma se desarrolla inmediatamente mediante un disolvente, tal como el acetato de etilo.

Los ejemplos siguientes, que se facilitan a título no limitativo, indican de qué modo este invento puede ponerse en práctica. En lo siguiente, la actividad se determina en todos los casos por dosificación biológica por el método de difusión, utilizando *Bacillus cereus* como germen sensible, y con relación a una muestra de 16.511 R.P., puro tomado como patrón. Esta actividad se expresa en unidades (u) por milígramo para

- 15. los productos sólidos y en unidades por cc para las soluciones; (la unidad se define como la menor cantidad de productos que, disuelta en 1 cc de un medio de cultivo adecuado, inhibe el crecimiento del *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 en condiciones determinadas.

25. EJEMPLO 1 -

En un fermentador de 170 litros se cargan:

- Peptona 1200 g
- Extracto de carne 600 g
- Glucosa hidratada 1200 g
- Gelosa 120 g
- 30. - Agua de la población: complemento para 110 litros

33,7456



- Después de ajustarse el pH de la mezcla a 7,50 con 150 cc de sosa concentrada ($d = 1,33$) se esteriliza el medio por borboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Después del enfriamiento, el volumen del caldo es de 120 litros y el pH, de 6,9. Se siembra entonces con 200 cc de un cultivo en erlenmeyer agitado, de la cepa de *Streptomyces hygrosopicus* var. *tepidalitus* DS 21336. El cultivo se desarrolla a 27°C durante 29 horas, agitando, y aireando con aire estéril; estas condiciones son adecuadas para la siembra del cultivo productor.
- 5.
- 10.

El cultivo productor se realiza en un fermentador de 800 litros cargado con las substancias siguientes:

- 15.
- | | |
|-----------------------------------|------------------|
| - "Corn steep" | ... 13,750 kg |
| - Glucosa hidratada | ... 16,500 kg |
| - Aceite de soja | ... 8,250 litros |
| - Sulfato amónico | ... 1,100 kg |
| - Cloruro de cobalto, hexahidrato | ... 27,5 g |
- 20.
- Agua de la población: complemento para 515 litros

Después de ajustar el pH de la mezcla a 6,5 con 1250 cc de sosa concentrada ($d = 1,33$), se añaden:

- | | |
|-----------------------|--------------|
| - Carbonato de calcio | ... 2,750 kg |
|-----------------------|--------------|
- luego se esteriliza por borboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Después del enfriamiento, el volumen del caldo es de 550 litros y el pH, de 6,7. Se siembran con 55 litros del inóculo del cultivo en fermentador de 170 litros descrito anteriormente. El cultivo se lleva a cabo a 25°C durante 90 horas, agitando por medio de una turbina a 205 rpm y aireando con un
- 25.
- 30.



volumen de aire estéril de 25 m³/h. El pH del medio es entonces de 7,45 y el volumen de mosto, de 590 litros. La cantidad de antibiótico presente es de 250 u/cm³.

5. EJEMPLO 2 -

- Se reciben en una cuba, provista de dispositivos de agitación, 220 litros de mosto de fermentación, obtenidos en las condiciones del Ejemplo 1 y de una titulación de 300 u/cm³. Se añade al mosto el 70% de su volumen de butanol y el pH se ajusta a 9 bajo agitación, mediante 900 cc de sosa 5N. Después de 30 minutos de agitación, se agregan a la mezcla 15 kg de ayudante de filtración, y el caldo se filtra en filtro-prensa. La torta de filtración se lava con 50 litros de butanol y 50 litros de agua. El filtrado se decanta y la fase superior se separa. Así se recogen 205 litros de solución butanólica del antibiótico. Esta solución se concentra bajo presión reducida (20 mm de mercurio) a una temperatura inferior a 35°C, hasta un volumen de 2 litros. Al concentrado se le agregan 20 litros de hexano. El precipitado formado se escurre, se lava y se seca. Finalmente, se obtienen 143 g de antibiótico bruto dotado de una actividad de 300 u/mg.

25. EJEMPLO 3 -

- 140 g de producto bruto procedente del Ejemplo 2, se ponen en suspensión en una mezcla constituida por: 3 litros de butanol, 3 litros de acetato de etilo y 6 litros de agua. El pH de la fase acuosa se ajusta a 7 con 2 cc de ácido clorhídrico N y luego el

- 42 -
337456



- conjunto se agita durante 30 minutos. Después del reposo, la fase superior se separa, se trata con 6 g de negro decolorante y se filtra con un ayudante de filtración. El filtrado se concentra a presión reducida (20 mm de mercurio) hasta un volumen de 400 cc. El concentrado se precipita por adición de 4 litros de hexano. El precipitado formado se escurre, se lava y se seca. Así se recogen 26 g de un producto de una actividad de 780 u/mg.
- 5.
10. EJEMPLO 4 -
Se disuelven 26 g del producto procedente del Ejemplo 3, en 2,5 litros de acetato de etilo, por agitación durante 30 minutos. Después de este tiempo, el insoluble se separa por filtración y se desecha.
15. A la solución filtrada se le agregan 0,9 litro de agua y el pH de la mezcla se ajusta a 3, sometido a agitación, con ayuda de ácido clorhídrico N. La solución se agita inmediatamente durante 15 minutos y luego se decanta. La fase orgánica se concentra a 200 cc a presión reducida. Se agregan a continuación 500 cc de butanol y la concentración se prosigue hasta que el volumen final sea de 60 cc. El antibiótico se precipita en 600 cc de hexano, se escurre, se lava y se seca. Se obtienen así 9,5 g de antibiótico, cuyo título es de 1600 u/mg.
- 20.
25. EJEMPLO 5 -
Se disuelven en 1,25 litros de cloruro de metileno a 34°C, 120,5 g de antibiótico preparado como se ha descrito en el Ejemplo 4 y con una titulación de 1500 u/mg. La solución obtenida se filtra.
- 30.

337456



Se agregan en seguida 10 g de negro decolorante a la solución clarificada y luego se filtra de nuevo con ayuda de un ayudante de filtración. La solución obtenida se precipita por 19 litros de hexano. El 16.511 R.P., se escurre, se lava y se seca; se obtiene de este modo un producto cuyas características son las siguientes:

título biológico : 1745 u/mg

análisis elemental : C% = 65,8 H% = 7,8 O% = 22,75

10.

N% = 3,55

su espectro ultravioleta en solución de 10 mg/l en el metanol es el siguiente: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 682 \text{ a } 232 \text{ nm}$ (Máximo I)

$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 375 \text{ a } 350 \text{ nm}$ (Máximo II)

EJEMPLO 6 -

15.

En una cuba provista de un dispositivo de agitación, se reciben 590 litros del mosto preparado en las condiciones descritas en el Ejemplo 1, y con una titulación de 250 u/cc. El pH del mosto se ajusta a 9,5 mediante 2,45 litros de sosa 5N.

20.

Después de 30 minutos de agitación, se añaden al mosto 22,5 kg de ayudante de filtración y la suspensión se filtra en filtro-prensa. La torta de filtración se lava con 100 litros de agua. El filtrado, cuyo volumen es de 645 litros, se extrae a un pH 7,

25.

mediante 40% de su volumen de cloruro de metileno, utilizando un grupo de centrifugadores de contracorriente, de dos etapas de extracción.

30.

El extracto orgánico, cuyo volumen es de 185 litros, se lava con 18 litros de agua ajustando el pH a 8, y luego con 18 litros de agua, ajustando el

337456



- pH a 4. El extracto lavado se concentra inmediatamente bajo presión reducida (20 mm de mercurio) y a 25°C, a 11,5 litros de un concentrador instantáneo. El concentrado se trata con 50 g de negro decolorante y se filtra con ayuda de un ayudante de filtración. El concentrado tratado se restituye al concentrador en el que la destilación continúa, hasta alcanzar un volumen de 1 litro. El antibiótico se precipita a continuación por 10 litros de hexano. El precipitado se escurre, se lava y se seca obteniendo así 61 g de antibiótico de una titulación de 2153 u/mg.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 7 -

- En 50 cc de agua se ponen en suspensión 5 g de un producto preparado como se ha descrito en el Ejemplo 6. El pH se eleva a 9 por adición de 5,3 cc de sosa N. El residuo insoluble se elimina por filtración, eliminando así 32 mg de producto. La solución clarificada se liofiliza. Después del secado final se obtienen 5,15 g de antibiótico 16.511 R.P. en forma de sal sódica de una titulación de 1785 u/mg.
- 15.
- 20.

Su análisis elemental es el siguiente:

C % = 61,3 H % = 7,95 O % = 23,95 N % = 3,30 Na % = 3,75

EJEMPLO 8 -

- 10 litros de mosto preparados en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, se filtran a un pH de 9,5 (obtenido por adición de 50 cc de sosa 5N) en presencia de un ayudante de filtración. La torta se lava con 1 litro de agua y se obtienen 10 litros de filtrado cuyo título es de 177 u/cc. El pH del filtrado se ajusta a 7,5 por ácido clorhídrico N, y el
- 25.
- 30.



337456

filtrado se hace pasar por una columna que contenga 400 cc de resina Dowex 1 X 2 en ciclo cloruro (altura de la resina 28 cm, diámetro 2,4 cm). El caudal se regula a 1,5 l/h.

5. Después de pasar el filtrado, la columna se lava con 1 litro de agua y luego se eluciona con una solución de metanol conteniendo 20% de agua y 1% (peso/volumen) de cloruro sódico. Cuando se han recogido 5 litros de producto de elución, éste se concentra a presión reducida a 1 litro. El metanol residual se destila admitiendo ininterrumpidamente 2 litros de agua. El concentrado final obtenido se extrae a un pH de 7, sucesivamente, por 500 cc, 500 cc y luego 250 cc de butanol. El extracto cuyo volumen es de 1300 cc se concentra bajo presión reducida a un volumen de 50 cc.
- 10.
- 15.

El concentrado se precipita por 500 cc de hexano. El antibiótico bruto se escurre, se lava y se seca en vacío. Así, se obtienen 1,8 g de antibiótico cuyo título es de 900 u/mg.

20. EJEMPLO 9 -

En 50 cc de acetato de etilo se disuelven 5 g del 16.511 R.P., preparado como se ha descrito en el Ejemplo 5 y con una titulación de 1745 u/mg.

25. Esta solución se coloca en la cabeza de una columna que contenga 1 kg de kieselgel en suspensión en acetato de etilo; (el kieselgel, antes de ponerse en suspensión, se amortigua a un pH de 4 por medio de un amortiguador fosfato M/15 y luego se seca a 110° durante 12 horas). El soporte de cromatografía, ocupa una
30. altura de 103 cm en una columna de un diámetro de 5 cm.



337456

El caudal se regula a 600 cc/hora; después

del paso de la solución inicial, el cromatograma se desarrolla con acetato de etilo. El producto de elución se fracciona a la salida de la columna cada 200

5. cc. La actividad se sigue por cromatografía en capa delgada, absorción en el ultravioleta, y dosificación por difusión de las fracciones sucesivas. Las fracciones de elución nº 38 a 60 contienen el componente B del 16.511 R.P. Estas fracciones se reúnen y concentran a presión reducida (20 mm de mercurio) en un concentrador instantáneo, a 25°C, hasta un volumen de

10. 100 cc. El concentrado se precipita luego con 1 litro de hexano. El producto se escurre, se lava y se seca y así se obtienen 1,135 g de 18.051 R.P., de las características siguientes:

título biológico : 3080 u/mg

análisis elemental: C % = 64,7 H % = 8,2 O % = 23,75

N % = 3,35

espectro ultravioleta en solución de 10 mg/l en el

20. metanol:

$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 620 \text{ a } 233 \text{ nm (máximo I)}$

$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 360 \text{ a } 350 \text{ nm (máximo II)}$

cromatografía en capa delgada, soporte Kieselgel H,

disolvente acetato de etilo: Rf = 0,2.

25. EJEMPLO 10.

30. En 40 cc de agua se pone en suspensión 0,7 g de 18.051 R.P. preparado de acuerdo con las condiciones del Ejemplo 9. La solución se alcaliniza progresivamente mediante sosa N. La disolución completa se obtiene después de la adición de 1 cc de sosa y el pH

337456

2

es entonces de 8,5. La solución acuosa se filtra y luego se liofiliza. Se obtienen 0,7 g de 18.051 R.P. en forma de sal sódica:

título biológico por difusión : 2300 u/mg

- 5. composición elemental : C% = 62,1 H% = 7,9 O% = 23,25
N% = 3,3 Na% = 3

EJEMPLO 11 -

En un fermentador de 170 litros, se cargan:

- 10. - peptona ... 1200 g
- extracto de carne ... 600 g
- glucosa hidratada ... 1200 g
- gelosa ... 120 g
- agua de la población, complemento para 110 litros

Después de ajustar el pH de la mezcla a 6,95

- 15. con 120 cc de sosa concentrada (d = 1,33) se esteriliza el medio por borboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Después de la refrigeración, el volumen del caldo es de 120 litros y el pH, de 6,60. Se siembra entonces con 200 cc de un cultivo de erlenmeyer agitado,
- 20. de la cepa "Streptomyces lavendulae 22.408". El cultivo se desarrolla a 25°C durante 30 horas, agitando y aireando con aire estéril; estas condiciones son adecuadas para la siembra del cultivo productor.

El cultivo productor se realiza en un fermentador de 800 litros cargado con las sustancias siguientes:

- 25. - "corn steep" ... 11 kg
- glucosa hidratada ... 19,250 kg
- aceite de soja ... 8,250 litros
- sulfato amónico ... 1,100 kg
- cloruro de cobalto, hexahidrato ... 27,5 g
- 30. - agua de la población, complemento para 510 litros

337456

- 48 - 2



Después de ajustar el pH de la mezcla a 6,85 con 1100 cc de sosa concentrada ($d = 1,33$) se añaden:

- carbonato de calcio ... 2,750 Kg

5. y luego se esteriliza por borboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Después de la refrigeración, el volumen del caldo es de 550 litros y el pH, de 6,75. Se siembra con 55 litros del inóculo del cultivo en el fermentador de 170 litros mencionado anteriormente.
10. El cultivo se realiza a 25°C durante 87 horas, agitando con ayuda de una turbina que gira a 205 rpm y aireando con un caudal de aire estéril de 25 m³/h. El pH del medio es entonces de 7,45 y el volumen del mosto es de 560 litros. La cantidad de antibiótico presente es de 555 u/cm³.
- 15.

EJEMPLO 12 -

- En una cuba provista de un dispositivo de agitación, se reciben 560 litros del mosto preparado en el Ejemplo 11, cuyo pH se ajusta a 9,5 con 3,5 litros de sosa 5N. Después de 30 minutos de agitación, se añaden al mosto 22,5 kg de un ayudante de filtración, y la suspensión se filtra en filtro-prensa. La torta de filtración se lava a continuación en filtro mediante 100 litros de agua. El filtrado, cuyo volumen es de 600
20. litros, se extrae al pH de 7, por 50% de su volumen de
25. cloruro de metileno, utilizando un grupo de centrifugadoras de contracorriente de dos etapas de extracción. El extracto orgánico cuyo volumen es de 220 litros, se lava con 22 litros de agua, ajustando el pH a 8, y luego 22 litros de agua, ajustando el pH a 4. El extracto
- 30.



337456

lavado se concentra inmediatamente a presión reducida (20 mm de mercurio) y a una temperatura de 25°C, hasta un volumen de 11 litros en un concentrador de reciclado continuo. El concentrado se trata con 50 g de negro

- 5. decolorante y se filtra con ayuda de un ayudante de filtración. El filtrado se envía de nuevo al concentrador hasta que el concentrado tenga un volumen de 1 litro. El antibiótico se precipita en estas condiciones mediante 10 litros de hexano. El precipitado se
- 10. escurre, se lava y se seca. Así se obtienen 85 g de antibiótico 16.511 R.P. cuyas características son las siguientes:

- título biológico : 2170 u/mg
- análisis elemental: C % = 62,6 H % = 7,5 O % = 25,2
- 15. N % = 4,05

- espectro ultravioleta en solución de 10 mg/l en el metanol:

$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 465 \text{ a } 232 \text{ nm (máximo I)}$

20. $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 165 \text{ a } 345 \text{ nm (máximo II)}$

- cromatografía en capa delgada, soporte Kieselgel H, disolvente acetato de etilo: Rf = 0,1 - 0,2 - 0,35 0,60.

EJEMPLO 13 -

- 25. Se disuelven en 850 cc de acetato de etilo, 85 g de producto preparado, tal como se ha descrito en el Ejemplo 12 y de una titulación de 2170 u/mg.

Esta solución se coloca en la cabeza de una columna que contiene 1 kg de Kieselgel en suspensión

- 30. en acetato de etilo (el Kieselgel, antes de ponerse en

337456⁵⁰



suspensión, se amortigua a un pH de 5 con un amortiguador fosfato M/15, y luego se seca a 110°C durante 12 horas). El soporte de cromatografía, ocupa una altura de 101 cm en una columna de 5 cm de diámetro.

5. El caudal se regula a 2400 cc/hora. Después de pasar la solución inicial, el cromatograma se desarrolla con acetato de etilo. El efluente de la columna se fracciona. Después de pasar los dos primeros litros, se recoge una fracción central de 5 litros que contiene el componente B del antibiótico/R.P. Esta fracción se concentra a presión reducida (20 mm de mercurio) en un concentrador instantáneo a 25°C, hasta un volumen de 300 cc. El concentrado se precipita a continuación por 3 litros de hexano. El producto, se escurre, se lava y se seca, y así se obtienen 57 g de antibiótico 18.051 R.P. de las características siguientes:
- título biológico : 2480 u/mg
 - análisis elemental: C % = 64,9 H % = 8,2 O % = 22,75
10. N % = 4,05
- espectro ultravioleta en solución de 10 mg/l en el metanol:
15. $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 600$ a 233 nm (máximo I)
20. $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 270$ a 350 nm (máximo II)
25. $[\alpha]_D^{22} = -109 \pm 3^{\circ}$ (c = 1 metanol)
- cromatografía en capa delgada, soporte Kieselgel H, disolvente acetato de etilo : Rf = 0,2.
- 30.



337456

EJEMPLO 14 -

- En 200 cc de agua se ponen en suspensión 10 g de antibiótico 18.051 R.P., preparado de acuerdo con las condiciones del Ejemplo 13. La solución se alcaliniza progresivamente con sosa N. La disolución se obtiene después de añadir 10,4 cc. de sosa y el pH es entonces de 9,5. La solución se filtra y luego se liofiliza. Se obtienen 8,6 g de antibiótico 18.051 R.P. en forma de sal sódica, de las características siguientes:
- 5.
- 10.
- título biológico por difusión : 2100 u/mg
 - análisis elemental: C % = 65,5 H % = 9,6 O % = 20,8
N % = 3,5 Na % = 2,7
 - espectro ultravioleta, en solución de 10 mg/l en el metanol:
- 15.
- $$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 617 \text{ a } 233 \text{ nm (máximo I)}$$
- $$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 390 \text{ a } 355 \text{ nm (máximo II)}$$
- 20.
- $$\left[\frac{\times}{D} \right]_D^{22} = -138 \pm 3^2 \text{ (c = 1, metanol).}$$

EJEMPLO 15 -

- Trabajando en condiciones análogas a las descritas en el Ejemplo 11, pero utilizando la cepa "Streptomyces lavendulae 22.097", se obtiene un mosto con una titulación de 67 u/cc.
- 25.

EJEMPLO 16 -

Tratando 210 litros del mosto preparado en el Ejemplo 15 del modo descrito en el Ejemplo 2, se obtienen 6,6 g de antibiótico 16.511 R.P. cuyo espectro

337456



ultravioleta en solución a 10 mg/l en el metanol, es el siguiente:

5. $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 710 \text{ a } 232 \text{ nm}$ (máximo I)
- $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 372 \text{ a } 350 \text{ nm}$ (máximo II)

- N O T A -

10. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a dos solicitudes de patente presentadas en Francia, con fechas 2 de Marzo de 1966 y 13 de
15. Enero de 1967, bajo los números PV.51.696 y PV.91.136 acogándose por lo tanto, a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención, por 20
20. años en España: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DEL ANTIBIOTICO 16.511 R.P."; caracterizándose por lo siguiente:

25. 1ª.- Procedimiento de preparación del antibiótico 16.511 R.P., y de sus componentes individuales, caracterizado porque comprende cultivar aerobiamente un microorganismo del grupo que comprende *Streptomyces hygroscopicus* var. *tepidalitus* DS 21.336 [NRRL 3237], *Streptomyces lavendulae* 22.097 y *Streptomyces lavendulae* 22.408, en un medio nutri-

10 -
2 MAR 1961
SECRETARÍA DE SALUD
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

337456

tivo, extraer y purificar el antibiótico formado y fraccionar éste en sus componentes por un método físico-químico.

5. 2ª.- "Procedimiento de preparación del antibiótico 16.511 R.P."; tal y como queda substancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de cincuenta y tres hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

REONE-POULINCAS S.R.L.

J. GÓMEZ ACEBO Y MODET
Firmado: F. Hernández Ruiz