

363950



SECCION TECNICA  
CLASIFICACION I. P. C.  
CLASE C-12  
SUBCLASE K

# MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

## PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY.

RESIDENCIA: 740 South Alabama Street,

INDIANAPOLIS Indiana. U.S.A.

ENUNCIADO: "UN METODO PARA LA PRODUCCION DE UN  
ANTIBIOTICO".

Prioridad: Patente estadounidense n.º 707.841 del 23-2-1968  
(se indicará) 6-12-1968

ES



1 Este invento se refiere a un procedimiento para la  
producción de nuevos agentes antibióticos que comprenden los  
compuestos designados aquí con los nombres A204, A204II y  
sus sales.

5 Se proporciona un método de producción de un antibió-  
tico caracterizado por cultivar una variedad productora de  
antibiótico A204 de Streptomyces albus, en un medio de cul-  
tivo conteniendo fuentes asimilables de carbono, nitrógeno  
y sales inorgánicas, en condiciones aerobias sumergidas has-  
10 ta que dicho organismo produce una cantidad importante de  
A204 en dicho medio de cultivo.

También se proporciona un método de preparación de  
agentes antibióticos caracterizado por preparar en su forma  
pesticida y farmacéuticamente aceptable el compuesto A204,  
15 A204II, sus sales de metales alcalinos, metales alcalino-  
térreos y de nitrógeno básico o las mezclas de los mismos.

El compuesto A204 es descrito más específicamente co-  
mo un sólido cristalino blanco que funde a 96-98°C cuando  
se cristaliza en éter etílico; que es soluble en ésteres,  
20 benceno, hidrocarburos halogenados, dimetilformamida, dime-  
tilsulfóxido, éter y cetonas, ligeramente soluble en alcoh-  
les y muy ligeramente soluble en agua; que es ácido, con un  
grupo valorable de  $pK_a$  igual a 6,1; que tiene un peso mole-  
cular aparente de 900 aproximadamente, determinado a partir  
25 de los resultados de la valoración; que tiene una composi-  
ción aproximada de 61,74 % de carbono, 9,37 % de hidrógeno  
y 28,38 % de oxígeno; que tiene una rotación óptica especí-  
fica,  $(\alpha)_D^{25}$ , de +68,12° (c = 1 % en peso/volumen, en meta-  
nol); que cuando se mide en solución en cloroformo presen-  
30 ta las siguientes bandas distinguibles en su espectro de ab-



1 sorción infrarrojo, en el intervalo de 2,0 a 15,0 micras:  
2,95; 3,43; 5,95; 6,87; 7,26; 7,80; 8,52; 8,95; 9,17; 9,34;  
9,59; 9,82; 10,07; 10,24; 10,51; 10,77; 11,40; y 11,80 mi-  
5 cras y que no tiene un espectro característico de absorción  
en ultravioleta.

El compuesto A204II es descrito más específicamente  
en forma de su sal mixta de sodio y potasio que es un sólido  
cristalino blanco soluble en ésteres, benceno, hidrocar-  
buros halogenados, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, éter  
10 y cetonas, es ligeramente soluble en alcoholes y es muy li-  
geramente soluble en agua; que tiene un grupo valorable de  
pK<sub>a</sub> igual a 6,3 en una solución al 66 % de dimetilformamida  
en agua; que tiene una rotación específica,  $(\alpha)_D^{25}$ , de  
+42,3° (c = 1 % en peso/volumen, en metanol); y que cuando  
15 se mide en una solución en cloroformo presenta las siguien-  
tes bandas distinguibles en su espectro de absorción infra-  
rrojo sobre el intervalo de 2,0 a 15,0 micras: 3,20; 3,45;  
6,26; 6,90; 7,30; 7,68; 7,80; 8,20; 8,50; 8,80; 9,22; 9,39;  
9,59; 9,70; 9,82; 10,08; 10,26; 10,48; 10,83; 10,96; 11,30;  
20 11,55; y 11,78 micras.

La rotación óptica específica fué determinada en el  
compuesto ácido libre cristalino, secado a la temperatura am-  
biente en vacío sobre cloruro cálcico anhidro durante unas  
15 horas; la valoración fué una valoración electrométrica en  
25 una solución al 66% de dimetilformamida en agua; y se deter-  
minó el análisis elemental en los compuestos secados a va-  
cío a unos 80°C sobre pentóxido de fósforo.

Los antibióticos A204 y A204II se producen cultivan-  
do una variedad de Streptomyces albus en condiciones aeró-  
30 bias, en un medio de cultivo conteniendo una fuente asimila-



21 FEB 1959

1 ble de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas.

Los organismos se aislaron primero de unas muestras  
de suelos obtenidas en Perry, Florida, en Estados Unidos,  
suspendiendo unas porciones de las muestras de suelos en  
5 agua destilada estéril y extendiendo las suspensiones so-  
bre placas de ágar nutritivo. Las placas de ágar nutritivo  
sembradas fueron incubadas a unos 30°C durante varios días.  
Al final del periodo de incubación, se transfirieron las co-  
lonias de organismos productores de A204 a unos tubos incli-  
10 nados de ágar, mediante un aro de platino estéril. Los cul-  
tivos inclinados de ágar inoculados se incubaron después pa-  
ra formar cantidades mayores de inoculum para la producción  
del antibiótico A204.

Este organismo capaz de producir antibiótico A204 ha  
15 sido colocado en depósito permanente, sin restricción, con  
la colección de cultivos de la Northern Utilization Research  
and Development Division, Agricultural Research Service, De-  
partamento de Agricultura de Estados Unidos (anteriormente  
Northern Regional Research Laboratories), Peoria, Illinois  
20 y es asequible al público bajo la denominación de cultivo  
número NRRL 3384.

Debido a la incertidumbre de los estudios taxonómicos  
con el grupo Streptomyces de organismos, existe siempre un  
elemento de duda asociado con la clasificación de un organis-  
25 mo recién descubierto. No obstante, el organismo que produce  
el antibiótico A204 es aparentemente el más parecido, en sus  
características más importantes, a la descripción publicada  
de los organismos Streptomyces albus, Streptomyces albido-  
flavus y Streptomyces flaveolus. Sin embargo, consideramos  
30 que el cultivo es una variedad de S. albus (Rossia Doria)



1 Waksman y Henrici, basados en la descripción de la variedad  
neotipo de S.albus ATCC 3004 realizada por Lyons y Pridham,  
[J. Bacteriol. 83: 370-380 (1962)] y de la variedad S.albus  
5 de IMRU 3005 descrita por Waksman, [The Actinomycetes, Vol.  
II "Classification, Identification and Description of Genera  
and Species", Williams and Wilkins Co., Baltimore (1961)] .

A pesar de las similitudes, sin embargo, existen di-  
ferencias suficientes para distinguir el nuevo organismo em-  
pleado en este invento de todas las variedades previamente  
10 descritas de S.albus. Por lo tanto, hemos clasificado el  
organismo NRRL 3384 como una nueva variedad de Streptomyces  
albus.

Las descripciones detalladas contenidas aquí se hacen  
con especial referencia al organismo recién encontrado NRRL  
15 3384. No obstante, debe entenderse que la producción de an-  
tibiótico A204 por los mutantes en desarrollo de estos orga-  
nismos productores de A204 se encuentra dentro de los lími-  
tes de este invento. Estos otros mutantes pueden ser produ-  
cidos por procedimientos conocidos, por ejemplo sometiendo  
20 la variedad anterior a la acción de los rayos X, de la radia-  
ción ultravioleta o de los agentes químicos como las mosta-  
zas nitrogenadas.

Los métodos empleados en los estudios taxonómicos de  
la variedad de S.albus productora de antibiótico A204 fueron  
25 los recomendados por el International Streptomyces Project  
descritos por Shirling y Gottlieb, "Methods for Characteri-  
zation of Streptomyces Species", Intern. Bull. Systematic  
Bacteriol. 16, 313-340 (1966), junto con otros ensayos su-  
plementarios. Los ensayos de utilización de carbono se reali-  
zaron de acuerdo con el método descrito por Pridham y Gott-  
30



1 lieb, J. Bac. 56, 107 (1948). Los datos obtenidos en los  
 estudios taxonómicos están indicados más adelante en for-  
 ma tabular. Los nombres de los colores fueron atribuidos  
 de acuerdo con el método ISCC-NBS (Kelly y Judd, "The ISCC-  
 5 NBS Method of Designating Colors and a Dictionary of Color  
 Names", Departamento de Comercio de Estados Unidos, Circu-  
 lar 553, Washington, D.C). Las cifras entre paréntesis se  
 refieren a la serie de colores Tresner y Backus [Tresner y  
 Backus, "System of Color Wheels for Streptomyces Taxonomy",  
 10 Appld. Microbiol. 11:335-338 (1966)]. Los bloques de color  
 Maerz y Paul están encerrados entre corchetes. (Maerz y  
 Paul, 1950, Dictionary of Color. McGraw-Hill, New York).

TABLA I

Descripción del cultivo NRRL 3384

15	<u>Propiedad observada</u>	<u>Características</u>
	Morfología	Esporoforos espirales producidas conteniendo de 3 a 50 esporas por cadena, generalmente de 10 a 50; esporas ovoidales a alargadas, 1,9 x 1,3 micras; superficies de espora lisas observadas en las mi- crografías electrónicas
20	CARACTERISTICAS DE CULTIVO SOBRE:	
	Maleato cálcico	Crecimiento abundante, verde ama- rillento pálido invertido [10E1]; esporulación y micelio aéreo abun- dantes, (7) amarillo pálido, 2Ba [11C1]; ningún pigmento soluble; medio ligeramente aclarado
25	Pasta de tomate - harina de avena	Crecimiento abundante, amarillo grisáceo invertido [11B2]; esporu- lación y micelio aéreo abundantes, (W) blanco a; ningún pigmento so- luble
30	ICP nº 2 (Agar de levadura - malta)	Crecimiento abundante, amarillo grisáceo invertido [11B2]; esporu- lación y micelio aéreo abundante, (Y) amarillo pálido, 2ba [11C1]; ningún pigmento soluble.



21 FEB 1951

TABLA I (continuación)

	<u>Propiedad observada</u>	<u>Características</u>
1	ICP nº 3 (Agar de harina de avena)	Crecimiento regular, blanco invertido; esporulación y micelio aéreo regular (W) blanco <u>a</u> ; ningún pigmento soluble
5	ICP nº 4 (Agar de sales inorgánicas-almidón)	Crecimiento abundante, amarillo grisáceo invertido [11B2]; esporulación y micelio aéreo abundantes (Y) amarillo pálido <u>2ba</u> [11C1]; ningún pigmento soluble
10	ICP nº 5 (Agar de glicerol-asparraguina)	Crecimiento abundante, verde amarillento pálido invertido 10B1; esporulación y micelio aéreo abundantes (W) blanco <u>a</u> ; ningún pigmento soluble
	Agar de Czapek	Crecimiento bueno, blanco invertido; esporulación y micelio aéreo buenos (W) blanco <u>a</u> ; ningún pigmento soluble
15	Agar de <u>tirosina</u> <u>Glucosa-asparraguina</u>	Crecimiento muy pobre; ningún color atribuido
20	Agar de <u>Emerson</u>	Crecimiento abundante, amarillo grisáceo invertido [12B3]; esporulación y micelio aéreo abundantes (GY) gris amarillento, <u>2dc</u> [10A2]; ningún pigmento soluble
25	Agar de <u>Bennett</u>	Crecimiento muy pobre; ningún color atribuido
	Agar <u>nutritivo</u>	Crecimiento regular, amarillo grisáceo invertido [11B2]; esporulación y micelio aéreo regulares (W) blanco <u>a</u> ; ningún pigmento soluble
	Acción sobre la leche	Ninguna variación al cabo de 14 días
	Reducción de nitratos	Positiva
	Producción de melanina	Positiva
30	Agar de peptona - hierro	Negativa



TABLA I (continuación)

1	<u>Propiedad observada</u>	<u>Características</u>
	Triptona - extrac- to de levadura	Negativa
5	Licuefacción de gela- tina	Nula a los 14 días
	Requisitos de tempe- ratura	Crecimiento y esporulación: regula- res a 26°; buenos a 30°; crecimen- to vegetativo a 37°; trazas de cre- cimiento, vegetativo solamente, a 43- 49°. Crecimiento nulo a 55°.
10	Respuesta del micelio del sustrato a los cambios de pH	Todos los medios excepto el ICP nº 4 quedan sin afectar. Cambio del ICP nº 4 de marrón a blanco o incoloro cuando se trata con HCl 0,05 N o NaOH 0,05 N
	Respuesta del pigmen- to soluble a los cam- bios de pH	Ningún pigmento soluble
	<u>Utilización de carbono</u>	
15	L-arabinosa	+
	Sacarona	(-)
	D-xilosa	(+) )
	D-fructosa	(+) )
	Glucosa	+
20	Ramnosa	+
	Refinosa	+
	I-inositol	+
	D-manitol	+
	Menos carbono (control)	-
25	Clave de utilización:	
	+ = positivo	
	(+) = utilización probable	
	(-) = utilización dudosa	
	- = utilización nula	
30	El medio de cultivo que se puede emplear en la produc-	



21 FEB - 1969

1 ción del antibiótico A204 por cultivo del organismo antes  
descrito puede ser uno cualquiera de diversos medios puesto  
que, como resulta evidente de los ensayos de utilización an-  
tes descritos, el organismo es capaz de utilizar diferentes  
5 fuentes de energía. Sin embargo, por economía de producción,  
rendimiento máximo de antibiótico y facilidad de aislamiento  
del antibiótico, son preferibles ciertas fuentes nutritivas  
relativamente sencillas. Por ejemplo, los medios que son úti-  
les en la producción del antibiótico comprenden una fuente  
10 asimilable de carbono como glucosa, fructosa, almidón, gli-  
cerina, melazas, dextrina, azúcar moreno y similares. La fuen-  
te preferida de carbono es la glucosa. Además, pueden emplear  
se otros medios como una fuente de nitrógeno asimilable, por  
ejemplo harina de soja, sólidos de infusión de maíz, leva-  
15 dura, harina de semilla de algodón, extracto de buey, pecto-  
nas (de carne o de soja), caseína, mezclas de aminoácidos y  
similares. Las fuentes preferidas de nitrógeno son las pec-  
tonas, la harina de soja, las mezclas de aminoácidos y simi-  
lares. Entre las sales inorgánicas nutritivas que pueden ser  
20 incorporadas a los medios de cultivo se encuentran las sales  
habituales capaces de formar iones sodio, potasio, amonio,  
calcio, fosfato, sulfato, cloruro, carbonato y análogos.

También deben ser incluidos en el medio de cultivo  
los elementos menores necesarios para el crecimiento y desa-  
25 rrollo óptimos de los organismos utilizados para la produc-  
ción del antibiótico A204. Estos elementos traza normalmen-  
te aparecen como impurezas en los otros constituyentes del  
medio en cantidades suficientes para cumplir los requisitos  
del crecimiento del actinomicetes empleado en este invento.

30 Puede variarse el pH inicial del medio de cultivo.



1969

1 No obstante, se ha encontrado que es aconsejable que el pH  
inicial del medio esté comprendido entre 6,5 y 7,5. Como  
se ha observado con otros actinomicetes el pH del medio  
aumenta gradualmente durante el periodo de crecimiento del  
5 organismo mientras se está produciendo el antibiótico y pue-  
de alcanzar un nivel comprendido entre 7,0 y 7,6 o más, de-  
pendiendo el pH final, por lo menos en parte, del pH inicial  
del medio, de los reguladores presentes en el mismo y del  
periodo de tiempo durante el que se permite el crecimiento  
10 del organismo.

Las condiciones de cultivo aeróbicas sumergidas son  
las condiciones de elección para la producción del antibió-  
tico A204. Para la preparación de cantidades relativamente  
pequeñas pueden emplearse matraces sacudidos y cultivos su-  
15 perfciales en frascos; pero para la preparación de grandes  
cantidades se prefiere el cultivo aerobio sumergido en tan-  
ques estériles. El medio contenido en el tanque estéril pue-  
de ser inoculado con una suspensión esporulada; pero debido  
al retraso del crecimiento experimentado cuando se utiliza  
20 como inoculum una suspensión esporulada, se prefiere la for-  
ma vegetativa del cultivo. Evitando así el retraso del cre-  
cimiento, se consigue un uso más eficiente del equipo de fer-  
mentación. En consecuencia es aconsejable producir primero  
un inoculum vegetativo del organismo por inoculación de una  
25 cantidad relativamente pequeña de medio de cultivo con la  
forma spora del organismo y cuando se ha obtenido un inocu-  
lum vegetativo joven y activo, transferir asépticamente el  
inoculum vegetativo al tanque grande. El medio en el que se  
produce el inoculum vegetativo puede ser igual o distinto  
30 del medio utilizado para la producción en gran escala del



1 antibiótico A204.

El organismo que produce el antibiótico A204 crece dentro de un amplio intervalo de temperaturas, comprendido entre 25° y 37°C. La producción óptima de A204 parece tener  
5 lugar a temperaturas de 26-30°C. En general, la producción máxima del antibiótico se produce al cabo de unas 48-72 horas después de la inoculación del medio de cultivo.

Como es costumbre en los procesos de cultivo aerobio sumergido, se hace pasar aire esterilizado a través del medio de cultivo. Para un crecimiento del organismo y una producción de antibiótico A204 eficientes, el volumen de aire  
10 empleado en la producción en tanque de A204 es de 0,2 a 0,4 volúmenes de aire por minuto y por volumen de cultivo. El volumen preferido es de 0,35 volúmenes de aire por minuto y por volumen de medio de cultivo.

La concentración de la actividad de antibiótico en el medio de cultivo puede ser seguida fácilmente durante el periodo de fermentación determinando en unas muestras del medio de cultivo su actividad inhibitoria contra el crecimiento de organismos conocidos por ser inhibidos por la presencia del antibiótico A204. Se ha encontrado que son útiles para este fin los organismos Staphylococcus aureus, Sarcina lutea, Bacillus subtilis y Mycobacterium avium. La determinación de las muestras puede realizarse por los conocidos métodos turbidométrico o de placa-copa.  
20

En general, la producción máxima de A204 ocurre al cabo de 2 a 3 días después de la inoculación del medio de cultivo en los procedimientos de cultivo aeróbico sumergido o de cultivo en matraz sacudido.

30 La actividad antibiótica producida durante la fermentación



1 tación de A204 puede encontrarse en el caldo antibiótico o  
en el micelio o en ambos sitios. Por consiguiente, las técnicas de aislamiento empleadas en la producción de A204 están proyectadas para permitir la máxima recuperación del  
5 antibiótico de una cualquiera o de ambas fuentes. Así, por ejemplo, el caldo de fermentación tal como se obtiene puede ser filtrado y el filtrado extraído con un disolvente adecuado para recuperar la actividad antibiótica no retenida por la torta de micelio. Además se recupera el antibiótico  
10 presente en la torta de micelio mediante extracción a fondo con un disolvente adecuado. En cualquier caso, el antibiótico puede ser recuperado del disolvente de extracción por los métodos corrientes normalmente empleados en la técnica.

15 Los análisis químicos y físicos del A204 cristalino indican la presencia de 4-5 grupos metoxi.

La cromatografía de papel del antibiótico A204 sobre papel Whatman nº 1 dió los siguientes valores de  $R_f$ :  $R_f = 0,14$  en un disolvente de agua, metanol, acetona y benceno  
20 en una relación de volumen de 72:24,5:3:0,5;  $R_f = 0,87$  en un disolvente formado por solución acuosa al 10 % de n-propanol;  $R_f = 0,33$  en un disolvente que contiene agua, metanol y ácido acético en una proporción de 12:3:1 (la solución  
25 fué ajustada a pH 10,5 con  $NH_4OH$  y después a pH 7,3 con  $H_3PO_4$ ). En la determinación de los valores anteriores, el antibiótico fué aplicado al papel en solución metanólica. Se obtuvieron bioautografías colocando el cromatograma de papel sobre placas de ágar sembradas con Bacillus subtilis como organismo de ensayo.

30 Cuando el A204 es sometido a cromatografía en capa



1969

1 delgada sobre placas de gel de sílice en acetato de etilo como disolvente, utilizando como detector una pulverización de vainillina o ácido sulfúrico, presenta un valor de  $R_f$  de 0,8 aproximadamente.

5 La sal sódica del antibiótico A204 es un sólido blanco cristalino que funde a 144-145°C y tiene un peso molecular de 960 aproximadamente, determinado por análisis con rayos X. La sal sódica es soluble en ésteres, benceno, hidrocarburos halogenados, dimetilformamida, dimetil-sulfóxido, éter  
10 y cetonas y es ligeramente soluble en alcohol. La rotación óptica específica,  $(\alpha)_D^{25}$ , de la sal sódica cristalina del antibiótico A204, secada a la temperatura ambiente en vacío sobre cloruro cálcico anhidro durante unas 15 horas, vale +54,95° (c = 2 % en peso/volumen en metanol).

15 El espectro de absorción infrarrojo de la sal sódica del antibiótico A204 en cloroformo está mostrado en la Figura 2 que acompaña a esta memoria. Las bandas distinguibles en el espectro infrarrojo en el intervalo de 2,0 a 15,0 micras son las siguientes: 3,1-3,2 (ancha); 3,44; 6,26; 6,87;  
20 7,29; 7,67; 7,79; 8,45; 8,96; 9,11; 9,18; 9,36; 9,56; 9,82; 10,05; 10,26; 10,54; 10,95 y 11,77 micras.

El peso molecular de la sal de plata cristalina hidratada del antibiótico A204, determinado a partir de los valores obtenidos con rayos X, es alrededor de 1099. Los cristales de la sal de plata son incoloros pero son sensibles  
25 a la luz y a los rayos X, volviéndose de color pardo oscuro al cabo de dos días de irradiación en aire. La densidad observada de la sal de plata, medida por flotación en solución acuosa de  $ZnCl_2$  es de 1,293 g/cm<sup>3</sup>. La única regla de extinción es hkl: h + k = Zn, que indica el grupo espacial  
30



1 monoclinico  $C_2$  no centrado. Existen cuatro unidades monocli-  
nicas asimétricas y una molécula por unidad asimétrica en  
una celdilla unidad que tiene las siguientes dimensiones:  
a = 25,977 Å, b = 14,517 Å, c = 14,418 Å, β = 91,94 Å.

5 Como ocurre con muchos antibióticos, el antibiótico  
A204 contiene ocasionalmente varios componentes estrechamen-  
te relacionados. El segundo componente no se encuentra en  
todas las fermentaciones y, cuando se encuentra, generalmente  
está presente en cantidades de hasta 5 % del rendimiento to-  
10 tal. Este segundo componente menor, observado ocasionalmen-  
te, ha sido denominado arbitrariamente A204II. Hasta ahora  
solamente ha sido obtenido en forma de sal mixta de sodio y  
potasio. Se ha encontrado que la sal mixta de sodio y pota-  
sio de A204II tiene una actividad comparable a la del anti-  
15 biótico A204.

La media de varios análisis elementales de la sal  
mixta cristalina de sodio y potasio de A204, secada en vacío  
a unos 80°C sobre pentóxido de fósforo, dió los siguientes  
valores: 60,66 % de carbono, 8,76 % de hidrógeno y 27,09 %  
20 de oxígeno.

Varios análisis de absorción atómica indicaron que el  
compuesto era una sal mixta de sodio y potasio de diversas  
proporciones, conteniendo 1 mol de la mezcla de cationes por  
mol de A204.

25 La sal mixta de sodio y potasio de A204II no presen-  
ta un espectro característico de absorción en ultravioleta.

La cromatografía en capa delgada de la sal mixta de  
sodio y potasio del factor II sobre placas de gel de sílice  
dió un valor de  $R_f$  de 0,75 en un sistema a base de acetato  
30 de etilo, utilizando una pulverización de ácido sulfúrico



24 FEB 1969

1 como detector.

Los compuestos antibióticos del presente invento tienen aplicación industrial, farmacéutica, humana y veterinaria, empleándose el término industrial para distinguirlo de las aplicaciones en el hombre y los animales. Normalmente los compuestos se combinan por métodos conocidos con vehículos adecuados para proporcionar el pesticida deseado.

El antibiótico A204 y sus sales presentan una actividad excelente contra las infecciones coccidiósicas cuando son incorporados a la dieta de los pollos. Una proporción de 9 a 45 g del antibiótico A204 o de sus sales por tonelada de pienso es eficaz en el control de las infecciones simples de E. tenella, E. acervulina, y E. maxima. Los mismos niveles son eficaces en el control de una infección mixta de E. brunetti y E. tenella, así como de una infección mixta de ocho especies de coccidios (Coccivac tipo D).

Los compuestos de este invento también presentan actividad insecticida y acaricida. También presentan una acción inhibitoria contra el crecimiento de los organismos microbianos incluídas las bacterias Gram-positivas y los hongos que son patógenos para la vida animal y vegetal. También aquí los antibióticos son útiles para la esterilización de superficies alrededor de las piscinas, construcciones en granjas, alojamientos de ganado y similares y para el mantenimiento de tales superficies exentas de contaminantes bacterianos y fúngicos, cuando son incorporados a soluciones desinfectantes.

Los compuestos de este invento también presentan actividad contra el mildiu pulverulento de la judía y contra el virus enano del maíz a concentraciones comprendidas entre



1 16 y 400 ppm y por lo tanto también son útiles en el control de estos virus y hongos de las plantas.

Para ilustrar con más detalle el invento, se dan los siguientes ejemplos.

5

EJEMPLO 1

Producción en matraces sacudidos de antibiótico A204

La producción de antibiótico A204 en cultivos en matraces sacudidos es ilustrada por el siguiente ejemplo:

Se inocularon unas esporas de Streptomyces albus  
10 NRRL 3384 en un ágar inclinado nutritivo constituido por 10 g de dextrina, 2 g de una caseína digerida con enzima, 1 g de extracto de buey, 1 g de extracto de levadura, 20 g de ágar y agua suficiente para llegar a un volumen total de 1 litro. Los cultivos inclinados se inocularon con esporas  
15 de Streptomyces albus NRRL 3384 y se incubaron durante 4 a 5 días a 30°C. Los tubos inclinados se cubrieron con agua destilada estéril y se rascaron suavemente para separar los organismos y formar una suspensión acuosa de los mismos. Se utilizó 1 ml de la suspensión de esporas resultante para  
20 inocular cada porción de 100 ml del medio vegetativo.

El medio de cultivo vegetativo se preparó combinando 15 g de glucosa, 15 g de harina de soja, 5 g de sólidos de infusión de maíz, 5 g de cloruro sódico, 2 g de carbonato cálcico y agua corriente suficiente para hacer un volumen  
25 total de 1 litro. El inoculum vegetativo fué sacudido durante 48 horas a 30°C en un sacudidor recíproco con un recorrido de 2 pulgadas (5 cm) a 108 rpm. El inoculum así preparado fué utilizado después en la producción de antibiótico A204 en la forma descrita a continuación.

30

Se preparó un medio de producción de la siguiente



1 composición:

	Harina de soja	15 g/litro
	Caseína	1 "
	NaNO <sub>3</sub>	3 "
5	Jarabe de glucosa	20 "
	CaCO <sub>3</sub>	2,5 "
	Agua corriente	

Se introdujeron unas porciones de 100 ml del medio de producción en unos matraces Erlenmeyer de 500 ml, que después se esterilizaron a 120°C durante 30 minutos. Una vez fríos, cada uno de los matraces fué inoculado con un inóculo vegetativo al 5 % preparado en la forma antes descrita.

Los matraces de producción fueron agitados durante 48 horas a 30°C en un sacudidor rotatorio operando a 250 rpm. El pH del medio sin inocular varió entre 6,5 y 7,5. El pH de recogida al final del ciclo de fermentación estaba comprendido entre 7,0 y 7,6. Se encontró actividad antibiótica en el caldo y en el micelio. Esta actividad fué determinada ensayando el caldo y el micelio frente a Bacillus subtilis, empleando métodos conocidos en disco o en placa-copa.

La totalidad del caldo obtenido por el procedimiento anterior (25 litros) se filtró a vacío empleando tierra de diatomeas. La torta de micelio se extrajo 3 veces con medio volumen de metanol acuoso al 50 %. Se combinaron los 3 extractos miceliales y se concentraron a vacío para separar el metanol. El caldo filtrado y el concentrado acuoso de las soluciones de extracto micelial se combinaron, se ajustó el pH de la mezcla a 3 con ácido clorhídrico y la solución se extrajo 2 veces con medio volumen de acetato de



1 etilo. Se combinaron los extractos en acetato de etilo y se  
concentraron a sequedad, se volvieron a disolver en cloroformo  
5 (10 ml por cada gramo de sólidos) y la solución en cloroformo se pasó a través de una columna de 12 x 40 pulgadas  
(30 x 100 cm) de carbón Pittsburgh conteniendo 2 g de carbón  
por cada gramo de sólidos. A continuación se eluyó la columna con 5 a 10 veces del volumen original de cloroformo.

Las fracciones de eluato en cloroformo se combinaron, se concentraron a sequedad en vacío, se disolvieron en una  
10 pequeña cantidad de metanol templado y se enfriaron y los cristales resultantes se filtraron. Por recristalización se obtuvieron 8,9 g de cristales de antibiótico A204 con una potencia de 1200 a 1400 unidades microbiológicas por miligramo. Los cristales se identificaron como antibiótico A204 por RMN,  
15 IR, cromatografía en capa delgada y cromatografía en papel, como se ha descrito más arriba y por tener un punto de fusión de 93-98°C.

#### EJEMPLO 2

##### Producción de antibiótico A204

20 El antibiótico A204 se produjo por el procedimiento del Ejemplo 1, pero utilizando un medio de producción de la siguiente composición:

Glucosa	15 g
Harina de soja	15 g
25 Sólidos de infusión de maíz	5 g
NaCl	5 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g

y agua corriente suficiente para llevar el volumen total a 1 litro. El antibiótico producido fué identificado como  
30 A204 y tenía un punto de fusión de 96-98°C.



1

EJEMPLO 3

El antibiótico A204 fué producido por el procedimiento del Ejemplo 1, pero utilizando un medio de producción de la siguiente composición:

5

Glucosa	20 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
$\text{CaCO}_3$	8 g
KCl	4 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,4 g
Harina de soja	5 g

10

y agua corriente suficiente para llevar el volumen total a 1 litro. El antibiótico producido fué identificado como A204 y tenía un punto de fusión de 96-98°C.

EJEMPLO 4

15

El antibiótico A204 fué producido por el procedimiento del Ejemplo 1, pero utilizando un medio de producción con la siguiente composición:

20

Glucosa	10 g
Melazas comestibles	20 g
Peptona	5 g
$\text{CaCO}_3$	2 g

y agua corriente suficiente para llevar el volumen total a 1 litro. El antibiótico producido fué identificado como A204 y tenía un punto de fusión de 96-98°C.

25

EJEMPLO 5

Producción de antibiótico A204 en planta piloto

La producción de antibiótico A204 por fermentación sumergida en escala de planta piloto es ilustrada por el siguiente procedimiento:

30

Un matraz de 250 ml conteniendo 50 ml de un medio



1 vegetativo constituido por 10 g/litro de dextrosa, 25 g/li-  
tro de almidón soluble, 15 g/litro de sémola de nutrisoja,  
10 g/litro de licor de infusión de maíz y 2 g/litro de  $\text{CaCO}_3$   
5 en agua corriente, con un pH ajustado de 6,5 (NaOH), fué  
inoculado con una suspensión al 5 % obtenida por el método  
descrito en el Ejemplo 1 a partir de un cultivo inclinado  
de ágar nutritivo constituido por 10 g de glucosa, 10 g  
de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 0,01 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  
0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 20 g de ágar Meer (lavado tres veces)  
10 en 1 litro de agua desionizada. El medio vegetativo inocula-  
do fué incubado a unos  $30^\circ\text{C}$  durante 48 horas en un sacudidor  
rotatorio con un arco de 2 pulgadas (5 cm) de diámetro, ope-  
rando a 250 rpm. Una porción de 16 ml del cultivo vegetati-  
vo así obtenido fué empleada para inocular un matraz de 1 li-  
15 tro conteniendo 200 ml del medio vegetativo. El medio vege-  
tativo inoculado fué incubado a unos  $30^\circ\text{C}$  durante 30 horas  
en un sacudidor rotatorio con un arco de 2 pulgadas (5 cm)  
de diámetro, operando a 250 rpm. Una porción de 200 ml del  
cultivo vegetativo así obtenido fué empleada para inocular un  
20 fermentador de 40 litros conteniendo 25 litros de un medio  
acuoso de fermentación esterilizado, constituido por 0,2 g/  
litro de Dow Corning Antifoam, 25 g/litro de dextrosa, 15 g/  
litro de sémola de nutrisoja, 3 g/litro de melazas de banda  
negra, 1 g/litro de caseína y 2,5 g/litro de  $\text{CaCO}_3$  en agua  
25 corriente. La fermentación se mantuvo a una temperatura de  
 $30^\circ\text{C}$  durante 30 horas después de la inoculación. Durante  
toda la fermentación se estuvo agitando a una velocidad de  
420 rpm. La aireación durante la fermentación se realizó  
a razón de 0,4 volúmenes de aire por unidad de volumen de  
30 medio y por minuto. El aislamiento del antibiótico se llevó



21 FEB 1969

1 en la forma descrita en el Ejemplo 1. El antibiótico producido fué identificado como A204 y tenía un punto de fusión de 96-98<sup>o</sup> C.

EJEMPLO 6

5 Preparación de sales de antibiótico A204 a partir de caldo y micelio

Las sales de metal alcalino, amonio y amina del antibiótico A204 se preparan a partir del caldo y del micelio por el método del Ejemplo 7, ajustando el pH del caldo filtrado y del concentrado acuoso del extracto micelial combinados a 8,5 como mínimo, con el hidróxido de metal alcalino, amonio o amina apropiado, extrayendo dos veces con medio volumen de acetato de etilo y después procediendo en la forma antes descrita.

15 El ácido y sus sales también pueden ser cristalizados en diversas cetonas, ésteres, alcoholes y mezclas de benceno e hidrocarburos o pueden ser purificados por otros métodos conocidos en la técnica, como cromatografía en columna y similares.

20 EJEMPLO 7

Preparación de la sal sódica del antibiótico A204

A 100 mg de antibiótico A204, obtenido en el Ejemplo 1 y disuelto en 1 ml de acetona, se añade una gota de NaOH 5 N y 1 ml de agua. La mezcla se clarifica calentando ligeramente y se deja en reposo a -15<sup>o</sup>C hasta que se ha producido la cristalización. Los cristales se filtran y recristalizan en alcohol acuoso para dar 72 mg de la sal sódica de antibiótico A204 con un punto de fusión de 144-145<sup>o</sup>C.

30



1

EJEMPLO 8

Preparación de la sal potásica del antibiótico A204

La sal potásica se obtiene sustituyendo la sosa 5 N del método anterior por una gota de KOH 5 N.

5

EJEMPLO 9

Preparación de la sal de plata del antibiótico A204

10

Se disuelven 670 mg de la sal sódica del antibiótico A204 en 40 ml de metanol, se mezcla con una solución de 270 mg de nitrato de plata en 2 ml de agua y se deja en reposo a la temperatura ambiente durante 3 horas, en la oscuridad. La solución se evapora a sequedad y se lava con agua para separar el exceso de nitrato de plata. El residuo se disuelve en 10 ml de metanol con aplicación de calor, se filtra a través de un embudo de vidrio sinterizado mientras está todavía caliente y se deja en reposo durante 16 horas a 50°C. Se obtienen grandes cristales blancos rectangulares de la sal de plata del antibiótico A204 que se recristalizan en acetona acuosa para dar 450 mg de la sal de plata de antibiótico A204. La densidad de la sal se determina mediante rayos X y es alrededor de 1099.

15

EJEMPLO 10

Aislamiento del antibiótico A204II

25

Se disuelven 100 g de la sal mixta de sodio y potasio del antibiótico A204, obtenida en la forma descrita en el Ejemplo 6, en 500 ml de una mezcla de benceno/acetato de etilo (7:3). La solución se cromatografía sobre una columna conteniendo 2000 g de gel de sílice (Grace-Davison Chemical Co., Grado 62). La elución se lleva a cabo con una mezcla de benceno/acetato de etilo (7:3) y después de eluir las fracciones se realiza una cromatografía en capa

30



1 delgada sobre gel de sílice empleando acetato de etilo como  
solución de desarrollo y una pulverización de  $H_2SO_4$  como  
detección. En primer lugar eluye A204. Después de haber  
recogido aproximadamente 32 litros de disolvente, se cambia  
5 a una solución de benceno/acetato de etilo (1:1). La elución  
se prosigue hasta que no se detectan más manchas sobre las  
placas de gel de sílice para cromatografía en capa delgada.

Se combinaron las fracciones que contenían grandes  
concentraciones de A204II, se concentraron a sequedad y se  
10 cristalizaron en una solución de acetona/agua. Los cristales  
resultantes (3 g) se volvieron a cromatografiar en una  
columna que contenía 71 g de gel de sílice en una mezcla de  
benceno/acetato de etilo (7:3) y de nuevo la elución fué se-  
guida de cromatografía en capa delgada. Las fracciones que  
15 contenían solamente A204II se combinaron, se concentraron a  
sequedad y se cristalizaron en una solución de acetona/agua  
dando 788 mg de A204II cristalino (p.f. 177-179°C, con una  
actividad igual a 1550 unidades de A204/ml).

EJEMPLO 11

20 La actividad insecticida y acaricida del antibiótico  
A204 está resumida en la Tabla II.

En dicha tabla se utilizó la siguiente escala de cla-  
sificación:

	<u>Porcentaje de muertes</u>	<u>Clasificación</u>
25	0-10	0
	11-20	1
	21-30	2
	31-40	3
	41-50	4
30	51-60	5

21 FEB 1969



	<u>Porcentaje de muertes</u>	<u>Clasificación</u>
1	61-70	6
	71-80	7
	81-90	8
5	91-100	9

TABLA II

Eficacia del antibiótico A204 como insecticida

	<u>Insecto</u>	<u>Via</u>	<u>Clasificación (ppm)</u>					
			<u>1000</u>	<u>500</u>	<u>250</u>	<u>100</u>	<u>50</u>	<u>25</u>
10	Escarabajo mejicano de la judía	Estómago	8	4	0	-	-	-
	Gusano del Ejército del Sur	Estómago	8	9	8	8,5	3,5	3
	Afido del melón	Contacto	3,5	2	1	-	-	-
		Sistémico	7	0	0	-	-	-
15	Arañuela roja	Contacto	9	7	7	8	7	6
	Chinche de la asclepias	Contacto	9	9	4	3	1	2

EJEMPLO 12

Los niveles de inhibición se determinaron por el ensayo de dilución en ágar. En este ensayo, el organismo en estudio se extiende formando rayas sobre una serie de placas de ágar conteniendo diversas concentraciones de antibiótico A204 para determinar la concentración mínima de antibiótico A204 en mcg/ml (microgramos por minuto) en el substrato de ágar que inhibe el crecimiento del organismo durante un periodo de 24 horas.



1

TABLA III

	<u>Organismo de ensayo (variedad)</u>	<u>Concentración mínima de inhibición mcg/ml, 24 horas</u>
	Staphylococcus aureus (3055)	6,25
5	Bacillus subtilis (X12-1)	6,25
	Mycobacterium avium (X-85)	1,56
	Streptococcus faecalis	1,56
	Lactobacillus casei	1,56
	Leuconostoc citrovorum	0,39
10	Trichophyton mentagrophytes	25,00
	Xanthomonas phaseoli	100,00
	Botrytis cinerea	100,00
	Colletotrichum pisi	100,00
	Helminthosporum sativum	100,00
15	Pullularia sp.	100,00
	M. gruberi (HB-1) en cultivo de tejido MK <sub>2</sub>	100,00

La sal sódica del antibiótico A204 en forma de ácido libre presenta una actividad in vitro comparable.

EJEMPLO 13

20

Como ilustra la Tabla IV la sal mixta de sodio y potasio de A204II presenta acción inhibitoria contra el crecimiento de diversos organismos microbiológicos. Los niveles de inhibición fueron determinados en la forma antes descrita.

25

30

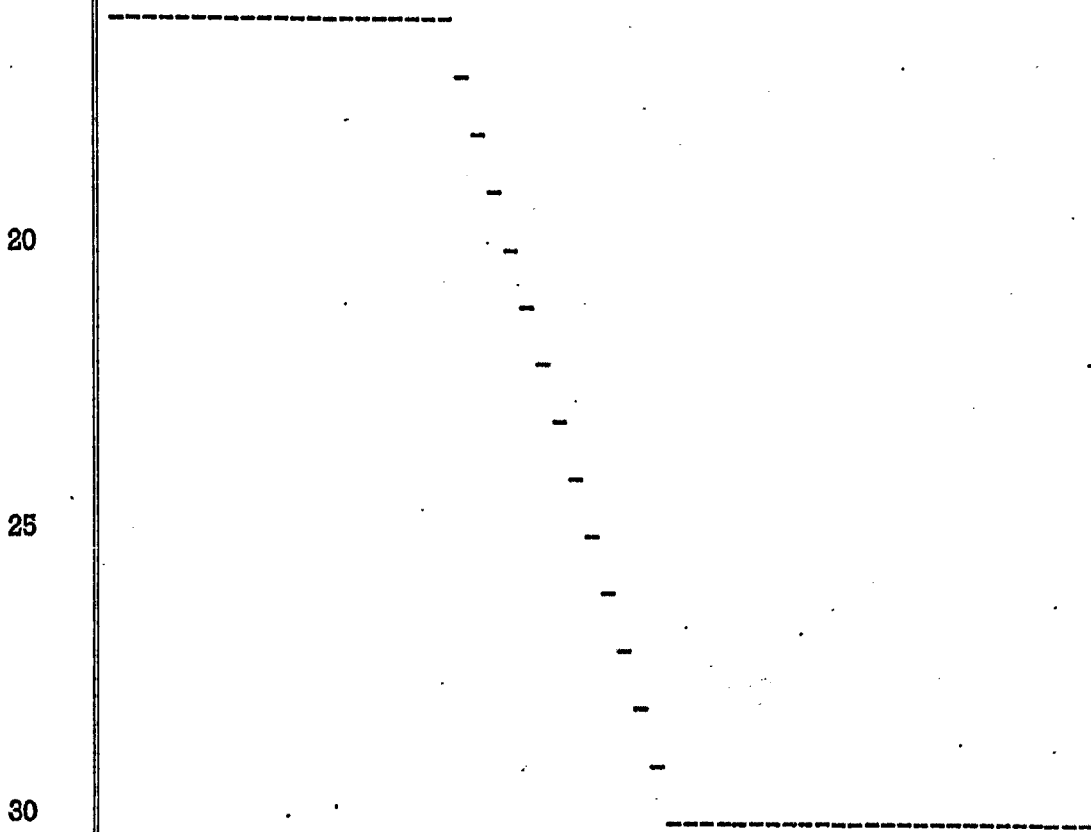


1

TABLA IV

	<u>Organismo de ensayo</u>	<u>Concentración mínima de inhibición mcg/ml</u>
	Staphylococcus aureus	12,50
5	Bacillus subtilis	3,12
	Mycobacterium avium	12,50
	Streptococcus faecalis	3,12
	Lactobacillus caseis	6,25
	Leuconostoc citrovorum	6,25
10	Alternaria solani	100,00
	Botrytis cinerea	50,00
	Colletotrichum pisi	50,00
	Helminthosporium sativum	50,00

15 En resumen, la Patente de Invención que se solicita  
recaerá sobre las siguientes:





1

REIVINDICACIONES

5

1. Un método para la producción de un antibiótico, caracterizado por cultivar una variedad de Streptomyces albus productora de antibiótico A204 en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones aerobias sumergidas, hasta que dicho organismo haya producido una cantidad importante de A204 en dicho medio de cultivo.

10

2. Un método según la Reivindicación 1, caracterizado porque el organismo es Streptomyces albus NRRL 3384.

15

3. Un método según la Reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el medio de cultivo se mantiene a una temperatura de unos 25° a 37° C y el crecimiento del organismo se lleva a cabo durante un periodo de 24 a 72 horas aproximadamente.

20

4. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 o 3, caracterizado por recuperar el A204 de dicho medio de cultivo.

25

5. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 o 3, caracterizado por recuperar de dicho medio de cultivo las sales de metales alcalinos, metales alcalino-térreos y nitrógeno básico del antibiótico A204.

30

6. Un método según las Reivindicaciones 1, 2, 3 o 4, caracterizado por recuperar el antibiótico A204 y el antibiótico A204II como sustancias distintas, convertir el antibiótico A204 en una sal de antibiótico A204, adsorber el antibiótico A204 de una solución de dicha sal sobre una resina adecuada y eluir selectivamente antibiótico A204II y A204 exento de A204II de dicha resina.

7. Un método para la preparación de agentes antibió-



1            ticos caracterizado por preparar en su forma pesticida y  
farmacéuticamente aceptable el compuesto A204, A204II y  
sus sales de metales alcalinos, metales alcalino-térreos o  
nitrógeno básico o mezclas de los mismos.

5            8. Un método según la Reivindicación 7, caracteriza-  
do porque el antibiótico preparado es un sólido cristalino  
blanco que funde a 96-98°C cuando se cristaliza en éter etí-  
lico; que es soluble en ésteres, benceno, hidrocarburos ha-  
10            logenados, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, éter y ce-  
tonas, es ligeramente soluble en alcoholes y es muy ligera-  
mente soluble en agua; que es ácido, conteniendo un grupo  
valorable de  $pK_a$  igual a 6,1; que tiene un peso molecular  
aparente de 900 aproximadamente, determinado a partir de  
15            los datos de la valoración; que tiene la siguiente composi-  
ción aproximada: 61,74 % de carbono, 9,37 % de hidrógeno y  
28,38 % de oxígeno; que tiene una rotación óptica específi-  
ca  $(\alpha)_D^{25}$ , de + 68,12° (c = 1 % en peso/volumen, en metanl);  
que cuando se mide en una solución en cloroformo presenta  
20            las siguientes bandas distinguibles en su espectro de absor-  
ción infrarrojo sobre el intervalo de 2,0 a 15,0 micras:  
2,95; 3,43; 5,95; 6,87; 7,26; 7,80; 8,52; 8,95; 9,17; 9,34;  
9,59; 9,82; 10,07; 10,24; 10,51; 10,77; 11,40 y 11,80 micras  
y que no posee espectro característico de absorción ultra-  
violeta.

25            9. Un método según la Reivindicación 7, caracteri-  
zado porque la sal mixta de sodio y potasio del antibiótico  
es un sólido cristalino blanco que es soluble en ésteres,  
benceno, hidrocarburos halogenados, dimetilformamida, dime-  
tilsulfóxido, éter y cetonas, es ligeramente soluble en al-  
30            coholes y es muy ligeramente soluble en agua; que tiene un



1  
  
  
  
5  
  
  
  
10  
  
  
  
15  
  
  
  
20  
  
  
  
25  
  
  
  
30

grupo valorable de  $pK_a = 6,3$  en una solución al 66 % de dimetilformaida en agua; que tiene una rotación específica,  $(\alpha)_D^{25}$  de  $+ 42,3^\circ$  ( $c = 1\%$  en peso/volumen en metanol) y que cuando se mide en una solución en cloroformo tiene las siguientes bandas distinguibles en su espectro de absorción infrarrojo sobre el intervalo de 2,0 a 15,0 micras: 3,20; 3,45; 6,26; 6,90; 7,30; 7,68; 7,80; 8,20; 8,50; 8,80; 9,22; 9,39; 9,59; 9,70; 9,82; 10,08; 10,26; 10,48; 10,83; 10,96; 11,30; 11,55 y 11,78 micras.

10. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN METODO PARA LA PRODUCCION DE UN ANTIBIOTICO".

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de veintinueve páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

Madrid, 21 de febrero de 1969

BERNARDO UNGRIA

p.p.



1969

A204

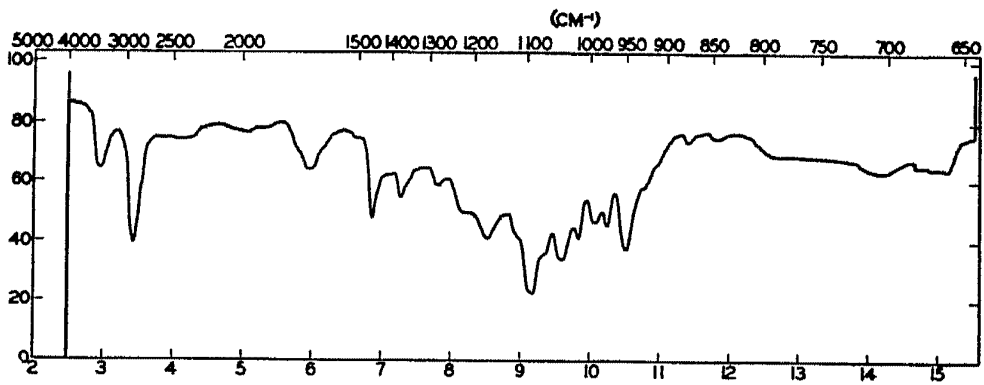


FIG.1

ESCALA VARIABLE  
MADRID, 21 DE febrero DE 19.69  
BERNARDO UNGRÍA  
P. P.

365710

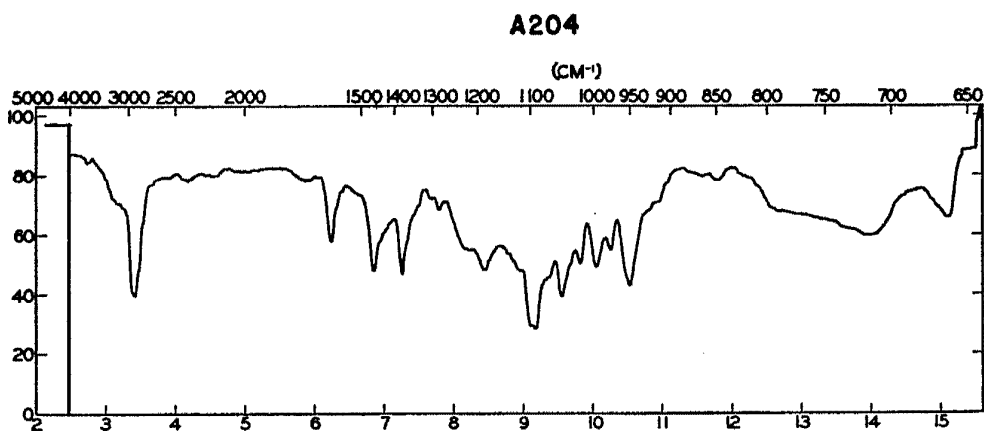


FIG. 2

ESCALA VARIABLE  
MADRID, 21 DE febrero DE 1969  
BERNARDO UNGRÍA  
P. P.