

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

(19) ES	(11) NUMERO	(10) A1
(21)	<b>470959</b>	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	<b>20 JUN. 1973</b>	

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

**PATENTE DE INVENCION**

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO		(32) FECHA	(33) PAIS
807.867		20 de junio de 1.977	NORTEAMERICA
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	
	C 12 D		
(54) TITULO DE LA INVENCION			
PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR EL ACIDO LIBRE DEL ANTIBIOTICO BL 580 ZETA.			
(71) SOLICITANTE (ES)			
AMERICAN CYANAMID COMPANY.			
DOMICILIO DEL SOLICITANTE			
Wayne, New Jersey, EE.UU. de A.			
(72) INVENTOR (ES)			
Martin Roy Hertz, John Henry Edward James Martin.			
(73) TITULAR (ES)			
(74) REPRESENTANTE			
GOMEZ--ACEBO			

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar un nuevo antibiótico designado BL580 ZETA, mediante fermentación; también se relaciona con métodos para la recuperación y concentración de dicho antibiótico a partir de soluciones puras, y con procedimientos para su purificación. La presente invención incluye dentro de su alcance el antibiótico BL580 ZETA en forma diluida, como un concentrado en bruto, y en su forma cristalina pura. Los efectos de este nuevo antibiótico como un agente anticoccidial junto con sus propiedades químicas y físicas lo diferencian de antibióticos anteriormente descritos.

El nuevo antibiótico de la presente invención es un ácido orgánico que por lo tanto es capaz de formar sales con iones de metales alcalinos. Así, sales formadas por mezcla del ácido libre antibiótico con cantidades estequiométricas de iones de metales alcalinos, convenientemente en un solvente neutro, son formadas con iones tales como ión sodio, ión potasio, ión amonio, y cationes relacionados. Las sales de iones de metales alcalinos de BL580 ZETA son, en general, sólidos cristalinos, relativamente insolubles en agua pero solubles en la mayoría de los solventes orgánicos comunes tales como metanol, acetato de etilo, acetona, cloroformo, heptano, éter, y benceno.

El nuevo antibiótico, que ha sido designado BL580 ZETA, se forma durante el cultivo bajo condiciones controladas de una nueva cepa mutante de Streptomyces hygroscopicus que se deriva del tratamiento de un aislado de colonia única de selección natural perteneciente a S. hygroscopicus NRRL 5647 con N-metil-N'-nitro-N"-nitrosoguanidina. Un cultivo viable de esta nueva cepa mutante ha sido depositado en el laboratorio de

Colección de Cultivo, Centro de Investigación Regional del Norte, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Peoria, Illinois y ha sido agregado a su colección permanente bajo su número de acceso NRRL 11108.

5 Las características culturales, fisiológicas y morfológicas de NRRL 11108 son sustancialmente iguales a aquellas de NRRL 5647 (como fué determinado por Dr. H. D. Tresner, División de Laboratorios Lederle, American Cyanamid Company, Pearl River, New York) excepto que NRRL 11108 produce poca o  
10 ninguna esporulación en la mayoría de los medios. Una descripción general de NRRL 5647 está publicada en la patente estadounidense Nº 3.812.249.

Se comprenderá que para la producción de BL580 ZETA, la presente invención no está limitada a su particular microorganismo ó microorganismos que responden totalmente a las características de crecimiento y microscópicas de NRRL 11108. En  
15 realidad, se desea y se quiere incluir el uso de mutantes producidas a partir de NRRL 11108 por diversos medios, tales como radiación X, radiación ultravioleta, mostaza de nitrógeno, fango exposición y similares.  
20

El antibiótico BL580 ZETA es un agente anticoccidial activo según queda evidenciado por los siguientes ensayos in vivo en donde se utilizó la siguiente dieta para ave:

	Premezcla de Vitamina Aminoácido .....	0,5 %
25	Vestigios Minerales .....	0,1 %
	Cloruro de Sodio .....	0,3 %
	Fosfato Dicálcico .....	1,2 %
	Piedra Caliza Molida .....	0,5 %
	Grasa estabilizada .....	4,0 %
30	Alfalfa Deshidratada (17 % proteína) .....	2,0 %

Harina de Gluten de Maíz (41 % proteína) .....	5,0 %
Harina de Pescado de Sábalo (60 % proteína) ....	5,0 %
Harina de Aceite de Soya (44 % proteína) .....	30,0 %
Maíz Amarillo Molido, fino.... hasta .....	100 %

5 La premezcla de vitamina-aminoácido en la dieta para ave precedente se preparó a partir de la siguiente formulación. La expresiones de cantidad se relacionan a unidades por kilogramo de la dieta para ave.

10 Hidroxi Tolueno Butilado .....	125 mg
dl-Metionina .....	500 mg
Vitamina A .....	3.300 U.I.
Vitamina D <sub>3</sub> .....	1.100 U.C.I.
Riboflavina .....	4,4 mg
Vitamina E .....	2,2 U.I.
15 Niacina .....	27,5 mg
Acido Pantoténico .....	8,8 mg
Cloruro de Colina .....	500 mg
Acido Fólico .....	1,43 mg
Bisulfato Sódico de Menadiona .....	1,1 mg
20 Vitamina B <sub>12</sub> .....	11 mcg
Maíz Amarillo Molido, fino..... hasta ....	5 g

Un inóculo mixto de 5000 oocistos esporulados de Eimeria acervulina y un número suficiente de oocistos de Eimeria tenella para producir 85 % a 100 % de mortandad en controles no tratados se proporcionó grupos de polluelos de siete días de vida, por inoculación directa en los cultivos de todos los polluelos. Los polluelos fueron otorgados libre acceso a la dieta para ave y agua durante el periodo de ensayo total. Dos días después de la inoculación, un alimento medicado, compuesto de la dieta para ave y diversos niveles de BL580 ZETA,

25

30

5 fué presentado a los diversos grupos de polluelos en el ensayo. Diez días después de la inoculación los ensayos se terminaron. Los polluelos se pesaron, se sometieron a autopsia y se examinaron sus tractos intestinales con relación a lesiones. Los resultados de este ensayo aparecen en la Tabla I siguiente. Estos resultados demuestran que se obtuvo un 80 % de sobrevivientes de polluelos infectados cuando se administró 60 ppm de BL580 ZETA a polluelos infectados en su dieta. Estos resultados también demuestran una supresión significativa de lesiones debido a Eimeria Tenella y Eimeria acervulina cuando se administra 30 ppm ó 60 ppm de BL580 ZETA a polluelos infectados en su dieta.

T A B L A I

Concentración de BL580 ZETA en Dieta ppm	Número de Aves Comenzadas	Porcentaje Sobreviviente	Porcentajes de Aves con Lesiones Reducidas	
			<u>Eimeria tene- lla</u>	<u>Eimeria acer- vulina</u>
0	40	15	0	0
60	10	80	80	90
30	10	50	10	50

25 El cultivo del microorganismo Streptomyces hygrosco-  
picus NRRL 11108 puede llevarse a cabo en una amplia variedad de medios de cultivo líquidos. Los medios que son útiles para la producción de antibiótico BL 580 ZETA incluyen una fuente asimilable de carbón tal como almidón, azúcar, melaza, glicerol, etc.; una fuente asimilable de nitrógeno tal como proteína, hidrolizado de proteína, polipéptidos, amino ácidos, licor de maíz macerado, etc.; y aniones y cationes inorgánicos tales como potasio, sodio, calcio, sulfato, fosfato, cloruro, etc.

Elementos vestigiales tales como boro, molibdeno, cobre, etc., son suministrados como impurezas de otros constituyentes en los medios. Se provee aeración en tanques y botellas forzando aire estéril a través o dentro de la superficie del medio fermentador. Se provee una agitación adicional en tanques mediante un impulsor mecánico. Puede agregarse según sea necesario un agente antiespumante tal como 1 % de octadecanol en aceite de manteca.

Se prepara un inóculo Streptomyces hygroscopicus NRRL 11108 en frasco agitador inoculando porciones de 100 ml de medio líquido estéril en frascos de 500 ml con raspados o lavados de esporas desde una platina de agar del cultivo. Generalmente se utiliza el siguiente medio:

	Harina de soya .....	1,0 %
15	Glucosa .....	2,0 %
	Licor de maíz macerado .....	0,5 %
	CaCO <sub>3</sub> .....	0,3 %
	Agua .....	c.s.ad 100 %

Los frascos se incuban a una temperatura de 25°C a 29°C, preferiblemente 28°C y se agitan vigorosamente en un agitador rotatorio durante 48 a 96 horas. Dos porciones de 100 ml de este inóculo se utilizan para inocular 12 litros del mismo medio estéril en una botella de 20 litros. Este inóculo se incuba con agitación y aeración de aire estéril durante 36 a 64 horas a 25°C-29°C, preferiblemente 28°C. Este inóculo se utiliza para inocular 300 litros del mismo medio estéril en un tanque fermentador. Este inóculo se incuba con agitación y aereación de aire estéril durante 36 a 64 horas a 25°C-29°C, preferiblemente 28°C. Este inóculo se utiliza para inocular un tanque de fermentación de 4000 litros que contienen 3000 li

tros de un medio estéril tal como el siguiente:

	Licor de maíz macerado .....	0,5 %
	Harina de soya .....	1,0 %
	Almidón de maíz .....	4,0 %
5	CaCO <sub>3</sub> .....	0,1 %
	Agua .....	c.s.ad ..... 100 %

Este medio se fermenta durante 100 a 200 horas a una temperatura de 27°C a 32°C con agitación mediante un impulsor y aeración a un régimen de 0,4-0,8 litros de aire por cada litro del medio por minuto. Normalmente se agrega un desespumante tal como Hodag<sup>®</sup> FD82 a una relación de aproximadamente 3,5 litros/1000 litros del medio.

Luego de completarse la fermentación, la masa fermentada que contiene el antibiótico BL580 ZETA se combina con aproximadamente la mitad de su volumen de acetato de etilo y se agita durante 2-3 horas. Se agrega una porción aproximada de 8 % de tierra de diatomeas y la mezcla se filtra a través de una placa y una prensa de filtro reticulado. La torta se lava en la prensa con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se recogen y se concentran en un alambique hasta un jarabe. El jarabe se agita con dos veces su volumen de n-heptano y se almacenan a 4°C. durante la noche. El sobrenadante se recupera por decantación y se concentra hasta un concentrado gomoso que se trata con 10 litros de metanol y se enfría con la ayuda de hielo seco durante varias horas. La mezcla se filtra a través de vidrio sinterizado con precubrimiento de tierra de diatomeas y se lava con metanol frío. La solución de metanol se concentra hasta un residuo siruposo en vacío.

Se prepara una columna cromatográfica con carbón activado a una relación de aproximadamente un litro de carbón por

50 gramos de carga. El residuo secado se disuelve en cloruro de metileno a una relación de 40 gramos/litro y se carga en la columna. El eluado de cloruro de metileno se recoge como un corte y se concentra hasta un jarabe. El residuo se mezcla con metanol y se almacena en un ambiente frío con hielo seco para reducir la temperatura a menos 10°C durante 15 minutos. Luego de 15 minutos el aceite solidificado se separa por filtración y el material soluble en metanol se concentra en vacío proporcionando un aceite. Este aceite se disuelve en una cantidad mínima de cloruro de metileno, se combina con gel de sílice, se concentra hasta que no está presente más solvente, y se carga en una columna de gel de sílice seca. La columna se desarrolla con 1:1 acetato de etilo:benceno. La columna se deja luego drenar. La sección de la columna que comprende Rf 0,10 a 0,45 se corta de la columna y se suspende en acetato de etilo:cloruro de metileno:metanol (2:2:1 en volumen). Esta mezcla se filtra, se lava con una mezcla solvente adicional y se concentra en vacío hasta sequedad.

Se prepara un sistema de dos fases mezclando n-heptano:metanol-acetato de etilo:agua (3000:1500:20:40 en volumen). Se mezcla Celatom<sup>®</sup> (Eagle-Picher Industries, Cincinnati, Ohio), una marca de tierra de diatomeas, con la fase inferior de este sistema a una relación de aproximadamente 2000 gramos/1650ml de fase inferior y se rellena en incrementos en una columna (7,5 cm de diámetro interno). La carga se aplica como una mezcla de tierra de diatomea, fase inferior, y producto liofilizado. La columna cargada se desarrolla con la fase superior y se recogen fracciones. La actividad se detecta mediante cromatografía de capa delgada en fracciones seleccionadas utilizando una placa de gel, cloroformo:acetato de etilo (1:1) como reve-

lador, y se carboniza con  $H_2SO_4$  para detección. Las fracciones 123-186 (final) se combinan y se concentran proporcionando el antibiótico BL580 ZETA.

5 La presente invención se describirá con mayores detalles en combinación con los siguientes ejemplos específicos.

EJEMPLO 1

Preparación de Inóculo

Se prepara un medio típico utilizado para desarrollar el inóculo primario de acuerdo con la siguiente fórmula:

10	Harina de soya .....	1,0 gm
	Glucosa .....	2,0 gm
	Licor de maíz macerado .....	0,5 gm
	$CaCO_3$ .....	0,3 gm
	Agua hasta .....	100 ml

15 Las esporas lavadas raspadas de la platina de agar de *Streptomyces higroscopicus* NRRL 11108 se utilizan para inocular dos frascos de 500 ml conteniendo cada uno 100 ml del medio precedente que ha sido esterilizado. Los frascos se colocan en un agitador rotatorio y se agitan vigorosamente durante 72 horas a 28°C. El inóculo de frasco resultante se transfiere a una botella de vidrio de 18,9 litros que contiene 12 litros del mismo medio estéril. Este inóculo secundario se airea con aire estéril mientras se realiza el desarrollo durante 48 horas a 28°C. El inóculo secundario resultante se transfiere a un tanque de 378 litros que contiene 300 litros del mismo medio estéril. Este inóculo terciario se airea con aire estéril a un régimen de un litro de aire/litro del medio/minuto y se agita mediante un impulsor que opera a 173 rpm. El desarrollo se continúa durante 48 horas a 28°C. El pH en este momento es 6,9 a 7,0.

20

25

30

EJEMPLO 2

Fermentación

Se prepara un medio de fermentación de acuerdo con la siguiente fórmula:

- 5           Licor de maíz macerado ..... 0,5 gm
- Harina de soya ..... 1,0 gm
- Almidón de maíz ..... 4,0 gm
- CaCO<sub>3</sub> ..... 0,1 gm
- Agua hasta ..... 100 ml

10           Una carga de 3000 litros de medio de fermentación de la formulación precedente en un tanque de 4000 litros se esteriliza a 120° durante 60 minutos. El pH del medio luego de esterilización es 6,4 a 6,5. Este medio se inocula con 300 li-  
15           tros de inóculo terciario preparado como se describe en el Ejem-  
          plo 1. La fermentación se lleva a cabo a 28°-29°C utilizando  
          11,0 litros de Hodag<sup>®</sup> FD82 como un agente desespumante. Se  
          suministra aeración a un régimen de 0,6 litro de aire estéril  
          por litro de masa por minuto. La masa se agita mediante un  
          impulsor accionado a 150 rpm. Al término de 138 horas de tiem-  
20           po de fermentación la masa se cosecha.

EJEMPLO 3

Aislación y Purificación

          Una porción de 2600 litros de masa fermentada prepara-  
25           da como se describió en el Ejemplo 2, que tiene un pH de 7,3,  
          se combina con 1300 litros de acetato de etilo y se agita du-  
          rante 1/2 hora. Se agrega una porción de 8 % (en peso) de tie-  
          rra de diatomeas. La mezcla se filtra en varias porciones, con  
          agitación, a través de un par de prensas reticuladas. Los fil-  
          trados de acetato de etilo acuosos se recogen proporcionando  
30           3300 litros que se dejan separar, proporcionando 1100 litros

de extracto de acetato de etilo. Luego de que cada porción de masa-acetato de etilo-tierra de diatomeas se filtra a través de una prensa, la almohadilla se lava en la prensa con acetato de etilo. Los lavados de acetato de etilo se combinan y se se-  
5 paran proporcionando 600 litros de lavados de acetato de etilo. Los 1100 litros de extractos de acetato de etilo y 600 li-  
tros de lavados de acetato de etilo se combinan y se concen-  
10 tran en un alambique de 1514 litros hasta aproximadamente 100 litros. Estos 100 litros se concentran adicionalmente en un alambique de 189 litros hasta 20 litros. Estos 20 litros se concentran adicionalmente en un alambique de vidrio hasta un jarabe. El jarabe se almacena a 4<sup>o</sup> C durante 48 horas y luego se agita con dos veces su volumen de n-heptano. La mezcla se deja reposar a 4<sup>o</sup> C durante la noche. El sobrenadante se recu-  
15 pera por decantación y se concentra hasta un residuo gomoso. Una porción de 10 litros de metanol se agrega al residuo gomo-  
so y la mezcla se enfría con la ayuda de hielo seco durante va-  
rias horas. La mezcla se filtra a través de vidrio sinteriza-  
do que contiene un prerecubrimiento de tierra de diatomeas y  
20 se lava con metanol frío. El filtrado y los lavados combina-  
dos se concentran hasta un jarabe en vacío proporcionando 1124  
gramos de residuo. Este residuo se disuelve en cloruro de me-  
tileno a un régimen de 33 gramos/litro. Se prepara una colum-  
na cromatográfica rellenando con 27 litros de carbón granular  
25 de malla 20x40. El residuo en cloruro de metileno se hace pa-  
sar a través de esta columna a un régimen de flujo de 400 ml.  
por minuto. El eluado de cloruro de metileno se recoge como  
un corte y se concentra hasta un jarabe. El residuo se mezcla  
a fondo con metanol. La mezcla se reduce a menos 10<sup>o</sup> C en un  
30 ambiente frío con la ayuda de hielo seco y se mantiene a -10<sup>o</sup> C

durante 15 minutos.

Cualquier aceite solidificado es eliminado mediante filtración y el filtrado de metanol se concentra hasta un jarabe en vacío proporcionando 363,8 gramos de un aceite.

5 Se prepara una columna cromatográfica de relleno seco rellenando 4 kg de gel de sílice en una columna plástica de 30,5 cm de circunferencia. Una porción de 200 gramos del aceite precedente se disuelve en una mínima cantidad de cloruro de metileno. Se agrega y se mezcla a fondo una porción de 300 gramos de gel de sílice y la mezcla luego se concentra en vacío hasta sequedad. La mezcla secada se carga en la columna y un poco de arena de mar se coloca en la parte superior de la columna para evitar disturbio del lecho durante la elución. La columna plástica se coloca en un armazón de vidrio para otorgar  
10 le soporte. La columna se eluye con 9,4 litros de 1:1 acetato de etilo:benceno. Se recogen cortes y la columna se deja secar. Se separa la sección de la columna de Rf 0,10 a Rf 0,45 y se suspende en acetato de etilo:cloruro de metileno:metanol (2:2:1). La mezcla se filtra y se lava con la misma mezcla  
15 solvente y se concentra hasta sequedad en vacío, proporcionando 22 gramos de residuo.

Se prepara un sistema de dos fases mezclando n-heptano:metanol:acetato de etilo:agua [3000:1500:20:40 (en volumen)]. Una porción de 2000 gramos de tierra de diatomeas lavada con ácido se mezcla con 1650 ml de la fase inferior de este sistema  
25 solvente se rellena en incrementos en una columna de vidrio (7,5 cm de diámetro interno). Se disuelven 22 gramos del residuo en la fase inferior, se filtra y el filtrado se mezcla con tierra de diatomeas y se carga en la columna. La columna cargada se desarrolla con la fase superior del sistema solvente y  
30

se recogen cortes por medio de un recolector de fracciones. El compuesto deseado se localiza analizando muestras de fracciones con cromatografía de capa delgada. Las fracciones 123-186 (final) se combinan, se concentra hasta un residuo en vacío, se disuelve en alcohol t-butílico y se liofiliza proporcionando 4,2 g del producto BL580 ZETA.

EJEMPLO 4

Preparación de la sal sódica de BL580 ZETA

Una porción de 900 mg de BL580 ZETA se disuelve en una mezcla de 30 ml de éter dietílico y 70 ml de éter de petróleo de baja evolución. Esta solución se agita junto con un volumen igual de agua. La mezcla se regula a pH 2,0 con HCl 1N mientras se agita. La fase acuosa se descarta. Se agrega agua fresca. El sistema de dos fases se agita y el pH se regula a 10,0 utilizando NaOH 0,1N. La emulsión resultante se centrifuga. La fase superior se concentra en vacío proporcionando un residuo blanco. Este residuo se disuelve en 15 ml de éter dietílico y 30 ml de éter de petróleo de baja evolución. La solución se deja evaporar en un ambiente frío a 4°C durante 18 horas reduciendo el volumen en aproximadamente 50%. El material insoluble se recoge por filtración y se lava con éter de petróleo proporcionando un sólido blanco. El filtrado se evapora y se trata como antes proporcionando un segundo cultivo. Este segundo filtrado se evapora y se trata como antes proporcionando un tercer cultivo. El primer cultivo y el tercero se combinan proporcionando 445 mg de la sal sódica de BL580 ZETA.

Esta sal sódica de BL580 ZETA tiene un punto de fusión de 162°C; una rotación específica  $[\alpha]_D^{20} = 3^\circ \pm 2^\circ$  (C - 0,94 en metanol); y un análisis elemental (por ciento): C :

60,97; H : 8,69; Na : 2,70. La sal sódica de BL580 ZETA exhibe absorción característica en la región del infrarrojo del espectro en las siguientes longitudes de onda: 2,93  $\mu$ ; 3,43  $\mu$ ; 6,12  $\mu$ ; 7,27  $\mu$ ; 8,63  $\mu$ ; 9,07  $\mu$ ; 9,57  $\mu$ ; 10,05  $\mu$  y 10,45  $\mu$ . Un espectro de absorción del infrarrojo normal de la sal sódica de BL580 ZETA se representa en la figura 1 de los dibujos que se acompañan. Un espectro de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  normal de la sal sódica de BL580 ZETA se representa en la figura 2 de los dibujos que se acompañan. Un espectro de resonancia magnética protónica normal de la sal sódica de BL580 ZETA se representa en la figura 3 de los dibujos que se acompañan.

#### EJEMPLO 5

##### Preparación del ácido libre de BL580 ZETA

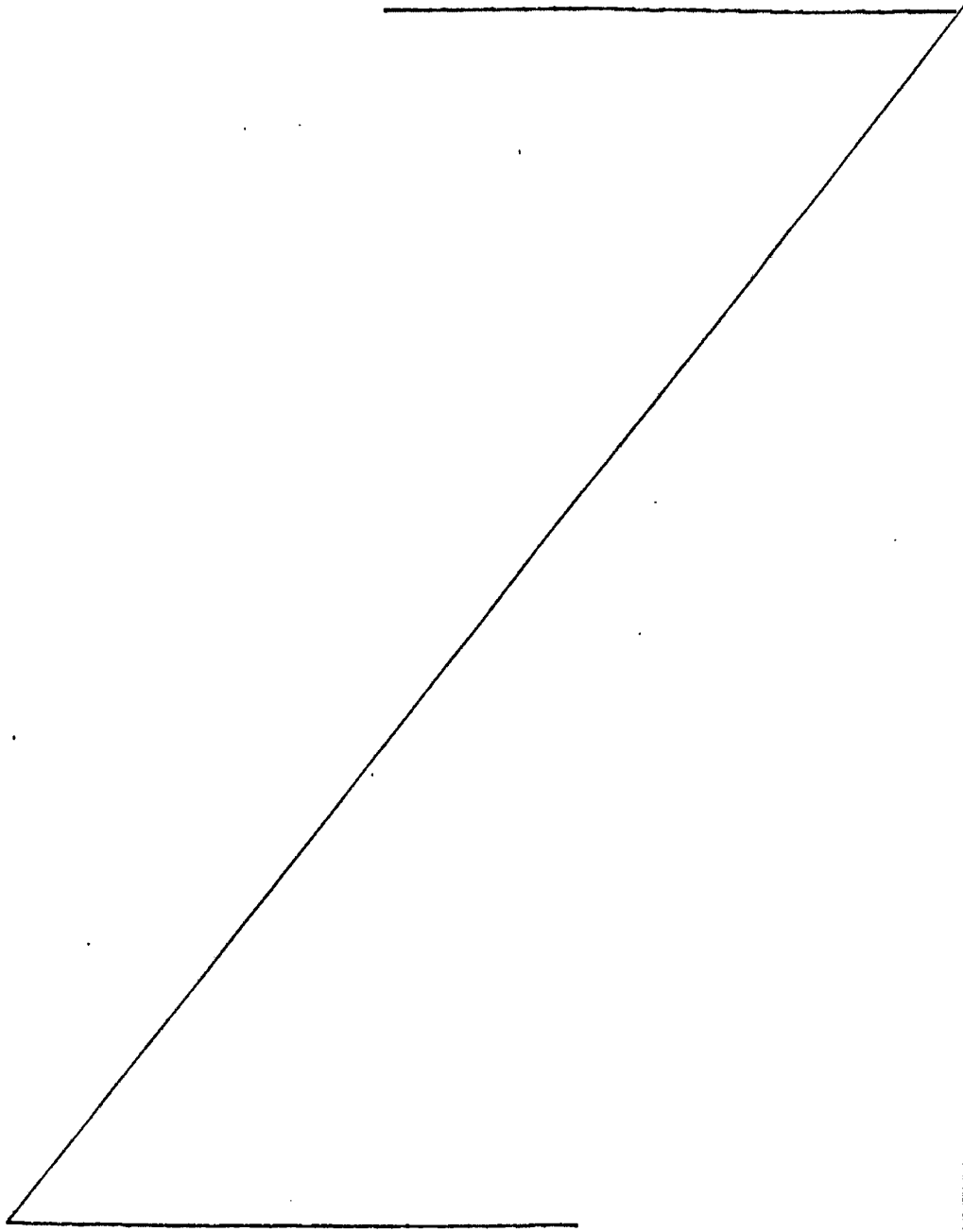
Una porción de 125 mg de la sal sódica de BL580 ZETA se disuelve en 100 ml de éter dietílico. Se agrega una porción de 100 ml de agua y el pH se regula a 2,0 con HCl 1N mientras se agita. La capa de éter se separa y se lava con una porción fresca de agua. El éter lavado se concentra en vacío. El residuo se disuelve en *t*-butanol y se liofiliza proporcionando 106 mg del ácido libre de BL580 ZETA.

Este ácido libre de BL580 ZETA tiene un punto de fusión de 105<sup>o</sup> - 107<sup>o</sup>C; una rotación específica  $[\alpha]_D^{20} = +7 \pm 2^{\circ}$  (C = 0,9 en metanol); y un análisis elemental (por ciento): C: 63,99; H: 9,43. El ácido libre de BL580 ZETA exhibe absorción característica en la región del infrarrojo del espectro a las siguientes longitudes de onda: 2,87  $\mu$ ; 3,40  $\mu$ ; 3,80  $\mu$ ; 5,87  $\mu$ ; 8,62  $\mu$ ; 9,02  $\mu$ ; 9,45  $\mu$ ; 9,57  $\mu$ ; 10,04  $\mu$  y 10,43  $\mu$ . Un espectro de absorción del infrarrojo normal del ácido libre de BL580 ZETA se representa en la figura IV de los dibujos que se acompa-

fian.

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.

5



REIVINDICACIONES

1<sup>a</sup>.- Procedimiento para preparar el ácido libre del  
antibiótico BL580 ZETA, cuyo compuesto: a) es efectivo como un  
agente anticoccidial; y en su forma cristalina esencialmente  
5 pura; b) tiene un punto de fusión de 105°-107°C; c) tiene el  
siguiente análisis elemental (por ciento): C: 63,99; H: 9,43;  
d) tiene una rotación óptica  $[\alpha]_D^{20} = +7^\circ \pm 2^\circ$  (C - 0,9 en me-  
tanol); e) tiene un espectro de absorción característica del  
infrarrojo (como se representa en la figura 4 de los dibujos)  
10 caracterizado porque comprende cultivar Streptomyces Hygroscopi-  
cus NRRL 11108 ó mutantes del mismo, en un medio nutritivo acu-  
oso que contiene fuentes asimilables de carbohidrato, nitrógeno,  
y sales inorgánicas, bajo condiciones aeróbicas sumergidas, has-  
ta que se imparte una actividad sustancial a dicho medio; y re-  
15 cuperar luego del mismo el antibiótico BL580 ZETA.

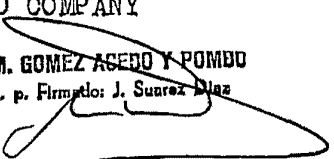
2<sup>a</sup>.- Procedimiento para preparar el ácido libre del  
antibiótico BL580 ZETA, tal y como queda sustancialmente des-  
crito en la presente Memoria e ilustrado en los adjuntos dibu-  
jos.

20 Esta Memoria consta de 16 hojas, escritas a máquina  
por una sola cara.

Madrid 20 JUN. 1978

AMERICAN CYANAMID COMPANY

J. M. GOMEZ ACEDO Y POMBO  
p. p. Firmado: J. Suarez Diaz



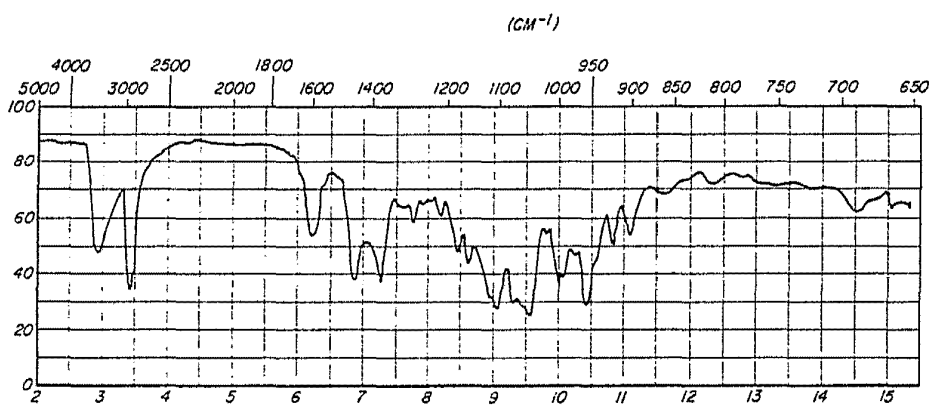


FIG. 1

Madrid 29 JUN 1976  
J. M. COMEZ ROSO Y PARRA  
p. p. Firmado: J. Suarez Diaz

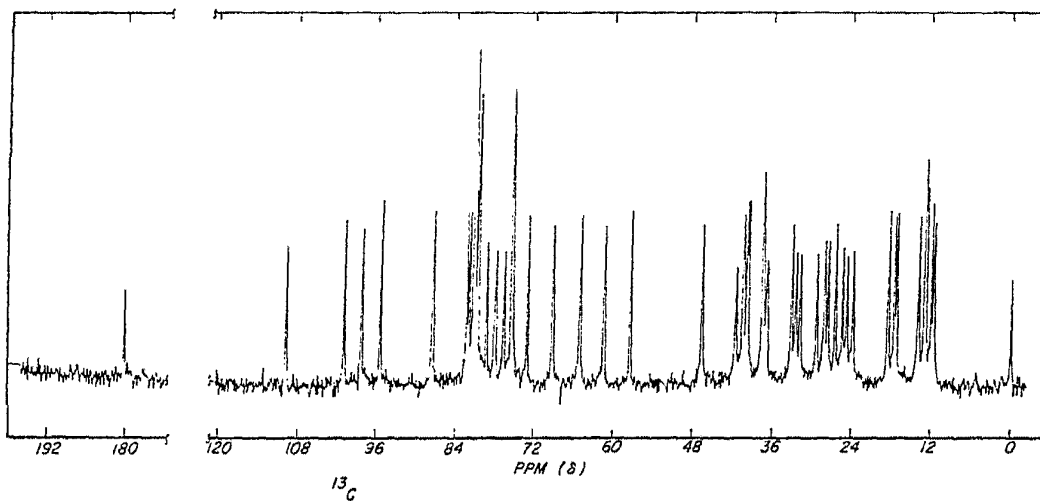


FIG. 2

21 JUN 1970

*[Handwritten signature]*

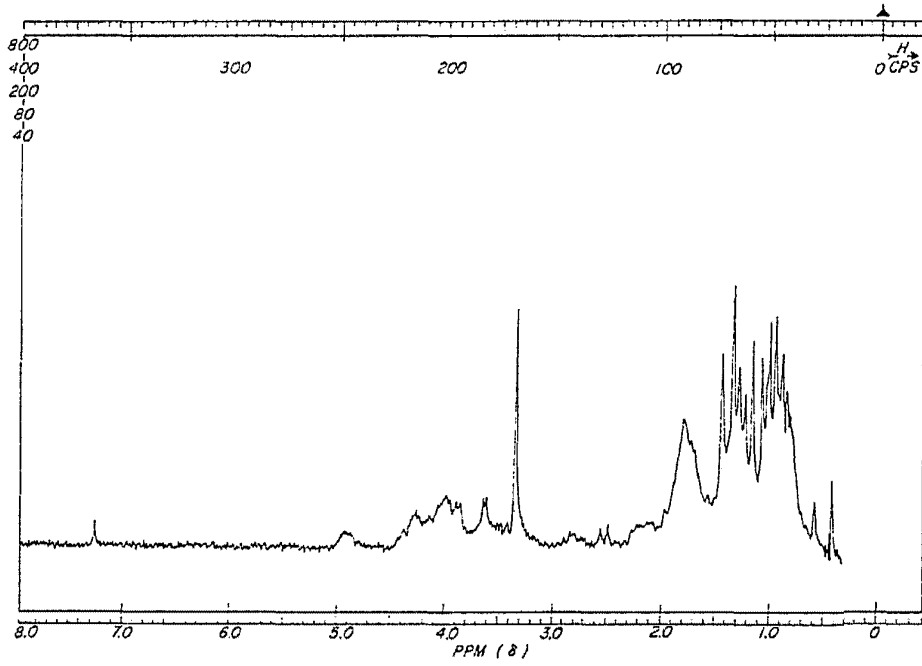


FIG. 3

29 JUN 1973

*[Handwritten signature]*

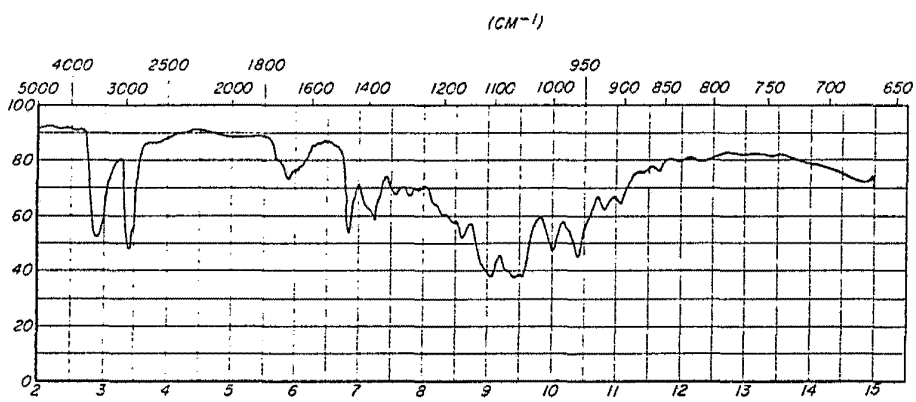


FIG. 4

ESCALA  
VARIABLE

20 JUN. 1973

*[Handwritten signature]*