

MNL



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	10	A1
		21	<b>485074</b>		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			16 Octubre 1.979		

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con la ley que figura en la presente solicitud y según el contenido de la Memoria adjunta.

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO		16 Octubre 1.978		ESTADOS UNIDOS
	951.695				

47	FECHA DE PUBLICIDAD	61	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C12D 9/16		

64	TITULO DE LA INVENCION
	UN METODO DE PRODUCCION DE LA MEZCLA ANTIBIOTICA A-21978-

71	SOLICITANTE (S)
	ELI LILLY AND COMPANY

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	307 East McCarty Street-Indianapolis, Indiana, 46206 ESTADOS UNIDOS

72	INVENTOR (ES)
	Robert L. Hamill y Marvin Martin Hoehn, ambos de nacionalidad estadounidense.

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 Aunque se conocen muchos agentes antibacterianos,  
se mantiene la necesidad de antibióticos mejorados. Los  
antibióticos difieren en su eficacia contra los organismos  
5 patógenos y continuamente se desarrollan cepas de organismos  
que son resistentes a los antibióticos actualmente utilizados.  
Además, los pacientes individuales frecuentemente  
experimentan graves reacciones a ciertos antibióticos específicos,  
debido a su hipersensibilidad y/o a los efectos  
10 tóxicos. Por lo tanto, continúa la necesidad de nuevos y  
mejorados antibióticos.

Los antibióticos A-21978C son antibióticos peptídicos  
ácidos estrechamente relacionados. Son miembros de esta  
clase de antibióticos anteriormente conocidos la cristalomicina,  
15 anfomicina, zaomicina, aspartocina y glutamicina  
[véase T. Korzybski, Z. Kowszyk-Gindifer y W. Kurylowicz,  
"Antibiotics-Origin, Nature and Properties", Vol. I, Pergamon  
Press, New York, N.Y., 1967, págs. 397-401 y 404-408];  
tsusimicina [J. Shoji y colaboradores, J. Antibiotics 21,  
439-443 (1968)]; laspartomicina [H. Naganawa y colaboradores,  
20 J. Antibiotics 21, 55 (1968)]; brevistina [J. Shoji y T.  
Kato, J. Antibiotics 29, 380-389 (1976)]; cerexina A [J. Shoji  
y colaboradores, J. Antibiotics 29, 1268-1274 (1976)] y  
cerexina B [J. Shoji y T. Kato, J. Antibiotics 29, 1275-  
25 1280 (1976)]. Entre estos antibióticos, se cree que la brevistina,  
la cerexina A y la cerexina B son los antibióticos  
de la técnica anterior más estrechamente relacionados con  
los nuevos antibióticos A-21978C.

Esta invención se refiere a la producción de sustancias  
30 antibióticas. En especial, se refiere a la producción  
de mezclas antibióticas que contienen varios factores. La

1 mezcla A-21978 contiene el factor principal C y los facto-  
res A, B, D y E. El antibiótico A-21978 factor C es una mez-  
cla de factores antibióticos estrechamente relacionados,  
que incluye los factores individuales C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y  
5 C<sub>5</sub> del antibiótico A-21978C. Por lo tanto, nos referiremos  
al antibiótico A-21978 factor C como mezcla A-21978C. Las  
sales de las mezclas A-21978 y A-21978C y de los factores  
individuales C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> de la mezcla A-21978C  
también forman parte de esta invención.

10 El término "mezcla" en el sentido utilizado en el  
campo de la fermentación y en esta memoria se refiere a una  
mezcla de factores antibióticos individuales producidos si-  
multáneamente. Como observarán los familiarizados con la  
producción de antibióticos por fermentación, el número y  
15 las proporciones de los factores individuales producidos en  
una mezcla antibiótica varían con las condiciones de fermen-  
tación utilizadas. En la mezcla A-21978C, los factores C<sub>1</sub>,  
C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> son factores mayoritarios y los factores C<sub>0</sub>, C<sub>4</sub> y  
C<sub>5</sub> son factores minoritarios.

20 Las sustancias antibióticas producidas por el proce-  
dimiento de esta invención son arbitrariamente denominadas  
aquí antibióticos A-21978. En las discusiones de la utilidad  
se utilizará el término "antibiótico A-21978", por razones  
de brevedad, para referirse a la mezcla A-21978, la mezcla  
25 A-21978C y los factores C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> del A-21978C  
y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Específicamente, la invención proporciona una mezcla  
antibiótica A-21978 que es producida por cultivo aerobio su-  
30 mergido de Streptomyces roseosporus NRRL 11379 o un mutante  
del mismo productor de A-21978.

1           Esta invención proporciona además la mezcla antibiótica A-21978C y los factores C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> que son componentes de la misma.

5           La invención también proporciona un método de producción de la mezcla A-21978 que consiste en cultivar Streptomyces roseosporus NRRL 11379 o un mutante del mismo productor de A-21978, en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones de fermentación aerobia sumergida, hasta que se ha producido una cantidad sustancial de actividad antibiótica.

10           Cuando se produce una cantidad sustancial de actividad antibiótica, la mezcla A-21978 se separa filtrando el caldo de fermentación, reduciendo el pH del filtrado a 3  
15           aproximadamente, permitiendo que precipite la mezcla y separando la mezcla por filtración. Para aislar los factores individuales de la mezcla A-21978C es necesario emplear separaciones cromatográficas. Los antibióticos A-21978 de esta invención inhiben el crecimiento de los organismos patógenos, especialmente de las bacterias Gram-positivas.

20           Los espectros de absorción en infrarrojo (pastilla de KBr) de los siguientes antibióticos A-21978C (en forma de sales sódicas) están presentados en los dibujos que acompañan a esta memoria, como sigue:

25           Figura 1 - mezcla A-21978C

            Figura 2 - A-21978C factor C<sub>1</sub>

            Figura 3 - A-21978C factor C<sub>2</sub>

            Figura 4 - A-21978C factor C<sub>3</sub>

            Figura 5 - A-21978C factor C<sub>0</sub>

30           Figura 6 - A-21978C factor C<sub>4</sub>

1

Figura 7 - A-21978C factor C<sub>5</sub>.

5

Los factores A-21978C de esta invención son antibióticos peptídicos estrechamente relacionados. Se recuperan hasta 6 factores antibióticos del caldo de fermentación y se obtienen en forma de mezcla, la mezcla A-21978C. Los factores individuales C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> Y C<sub>5</sub> son aislados como compuestos individuales en la forma descrita más adelante.

10

Los factores A-21978C son antibióticos polipeptídicos cíclicos, ácidos, estrechamente relacionados, que contienen un grupo acilo de ácido graso en el grupo amino terminal. Por hidrólisis, cada uno de los factores produce los siguientes aminoácidos:

15

20

<u>Aminoácido</u>	<u>Número de moles</u>
Acido aspártico*	4
Glicina	2
Alanina	1
Serina	1
Treonina	1
Triptófano	1
Ornitina	1
Kinurenina	1
Acido 3-metilglutámico**	1

25

\* Uno de los cuales puede ser asparagina

\*\* Puede proceder de la 3-metilglutamina.

30

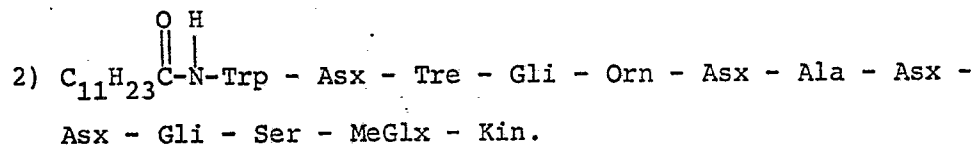
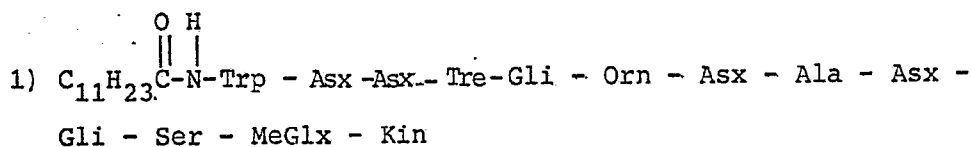
Cada uno de los factores A-21978C contiene un ácido graso. En la Tabla I se dan los átomos de carbono y la identidad, cuando es conocida, del ácido graso contenido en cada uno de los factores A-21978C.

TABLA I

Factor A-21978C	Acido graso	
	Número de carbonos	Identidad
C <sub>1</sub>	C <sub>11</sub>	ácido 8-metildecanoico
C <sub>2</sub>	C <sub>12</sub>	ácido 10-metilundecanoico
C <sub>3</sub>	C <sub>13</sub>	ácido 10-metildodecanoico
C <sub>0</sub>	C <sub>10</sub>	-
C <sub>4</sub>	C <sub>12</sub>	-
C <sub>5</sub>	C <sub>13</sub>	-

Las reacciones de degradación substractiva de Edman indican que el aminoácido N-terminal es el triptófano y que el radical ácido aspártico es el aminoácido adyacente más próximo.

Los estudios por cromatografía de gases y espectro de masas sobre el A-21978C factor C<sub>2</sub> indican que una de las dos siguientes secuencias puede ser la estructura de este factor (Asx indica el ácido aspártico o la asparagina y MeGlx indica el ácido 3-metilglutámico o la 3-metilglutamina):



La hidrólisis enzimática del A-21978C factor C<sub>2</sub>, utilizando carboxipeptidasa Y confirma que la kinurenina es el aminoácido C-terminal y que el grupo COOH C-terminal puede esterificar al grupo hidroxilo del radical treonina.

Basándose en los estudios citados, se cree tentativamente que la estructura de los antibióticos A-21978C es la siguiente:



1 insolubles en acetona, cloroformo, éter dietílico, benceno,  
acetato de etilo y disolventes hidrocarbonados. Las formas  
salinas de la mezcla y factores A-21978C son solubles en  
5 agua, metanol, dimetilformamida y dimetilsulfóxido pero son  
insolubles en disolventes como etanol, butanol y dioxano.

La Tabla II contiene la composición elemental porcentual  
aproximada de la sal sódica de cada uno de los factores  
A-21978C.

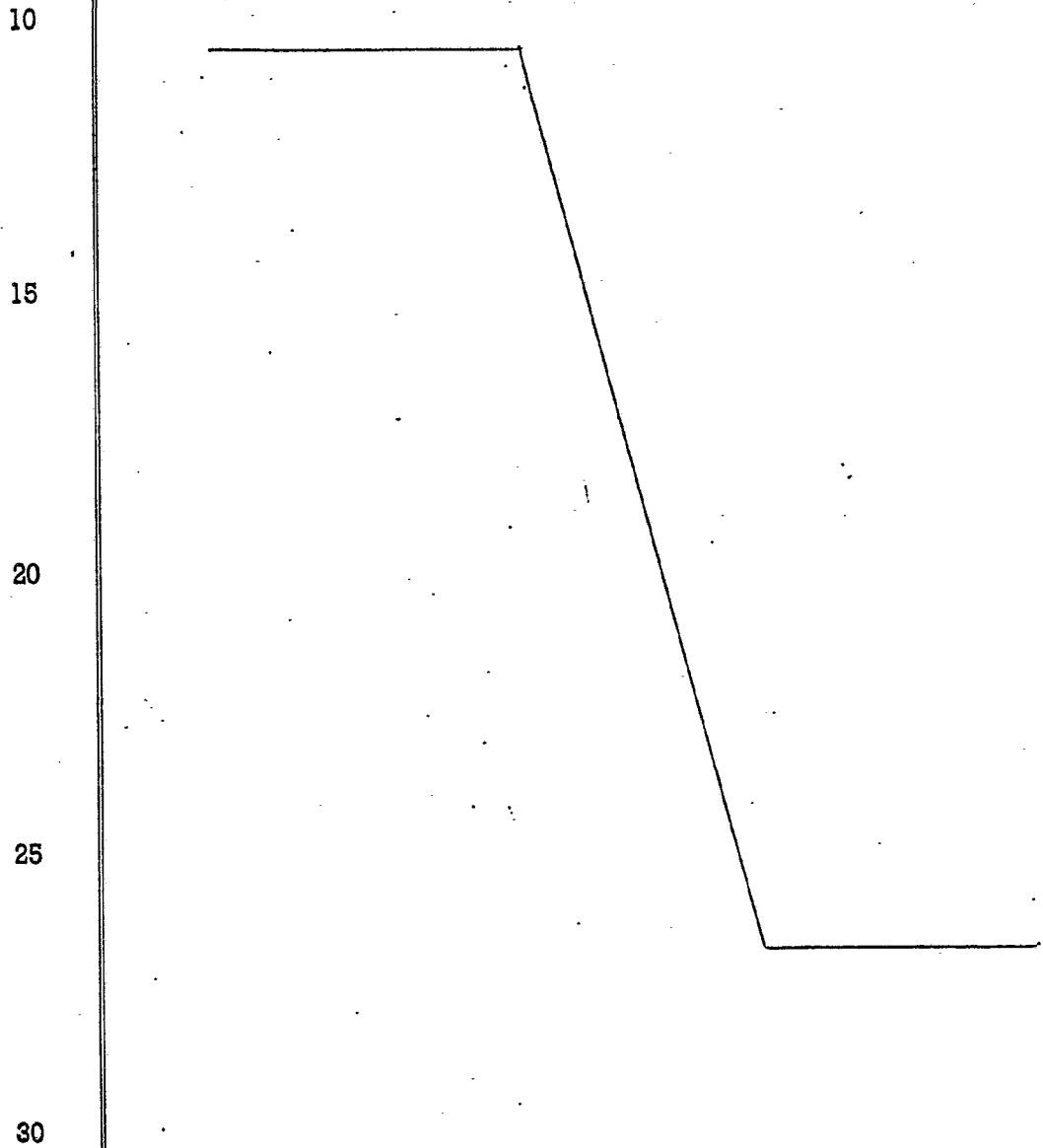


TABLA II

Factor A-21978C

Elemento	C <sub>0</sub>		C <sub>1</sub>		C <sub>2</sub>		C <sub>3</sub>		C <sub>4</sub>		C <sub>5</sub>	
	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado
Carbono	52,61	52,07	52,89	52,47	53,17	51,87	52,73	53,44	54,18	52,76	54,18	52,76
Hidrógeno	6,07	5,95	6,14	5,93	6,21	6,05	5,99	6,28	6,35	6,71	6,35	6,71
Nitrógeno	13,63	12,73	13,52	13,38	13,41	13,66	14,07	13,29	13,34	13,97	13,34	13,97
Oxígeno	26,28	25,84	26,06	26,19	25,84	25,86	25,81	25,63	25,06	25,60	25,63	25,60
Sodio*	1,40	3,41	1,39	2,03	1,38	2,56	1,40	1,36	1,07	0,96	1,36	1,07

\* Por diferencia.

Los espectros de absorción en infrarrojo de la mezcla y factores A-21978C (como sales sódicas) en pastilla de KBr están mostrados en las Figuras 1-7 de los dibujos que acompañan a esta memoria. La Tabla III contiene los máximos de absorción más significativos para cada uno de ellos.

TABLA III

Máximos IR (cm<sup>-1</sup>) de la mezcla y factores A-21978C

Mezcla	C <sub>0</sub>		C <sub>1</sub>		C <sub>2</sub>		C <sub>3</sub>		C <sub>4</sub>		C <sub>5</sub>	
	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado
3310	3300	3310	3300	3310	3310	3310	3310	3310	3320	3300	3300	3300
3050	3050	3040	3040	3050	3050	3040	3040	3050	3050	3045	3045	3045
2910	2910	2910	2910	2910	2910	2910	2910	2920	2920	2910	2910	2910
2840	2840	2840	2840	2840	2840	2835	2850	2850	2850	2840	2840	2840
1655	1650	1650	1650	1665	1650	1650	1655	1650	1655	1650	1650	1650
1540	1540	1535	1535	1535	1535	1535	1525	1525	1525	1525	1525	1525
1450	1445	1450	1450	1450	1450	1450	1455	1455	1455	1445	1445	1445
1395	1395	1395	1395	1400	1395	1395	1395	1395	1395	1390	1390	1390
1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310
1240	1215	1220	1220	1225	1225	1225	1225	1220	1220	1215	1215	1215
1160	1155	1160	1160	1160	1160	1160	1160	1160	1160	1155	1155	1155
1065	1060	1065	1065	1065	1065	1060	1065	1065	1065	1055	1055	1055
745	745	745	745	745	745	745	745	745	740	745	745	735
645	645	645	645	645	645	645	645	645	645	645	645	645
555	555	555	555	555	555	555	555	555	555	555	555	555
518	518	518	518	518	518	518	518	518	518	518	518	518

TABLA II

Factor A-21978C

Elemento	C <sub>0</sub>		C <sub>1</sub>		C <sub>2</sub>	
	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado
Carbono	52,61	52,07	52,89	52,47	53,17	51
Hidrógeno	6,07	5,95	6,14	5,93	6,21	6
Nitrógeno	13,63	12,73	13,52	13,38	13,41	13
Oxígeno	26,28	25,84	26,06	26,19	25,84	25
Sodio*	1,40	3,41	1,39	2,03	1,38	2

\* Por diferencia.

Los espectros de absorción en infrarrojo de la mezcla y factores de KBr están mostrados en las Figuras 1-7 de los dibujos que acompañan los máximos de absorción más significativos para cada uno de ellos.

TABLA III

Máximos IR (cm<sup>-1</sup>) de la mezcla y factores

Mezcla	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
3310	3300	3300	3310	3310
3050	3050	3040	3050	3040
2910	2910	2910	2910	2910
2840	2840	2840	2840	2835
1655	1650	1650	1665	1650
1540	1540	1535	1535	1535
1450	1445	1450	1450	1450
1395	1395	1395	1400	1395
1310				
1240	1215	1220	1225	1225
1160	1155	1160	1160	1160
1065	1060	1065	1065	1060
745	745	745	745	745
645				
555				
518				

TABLA II

Factor A-21978C

No	C <sub>1</sub>		C <sub>2</sub>		C <sub>3</sub>		C <sub>4</sub>		C <sub>5</sub>	
	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado	Encontrado	Calculado
3	52,47	53,17	51,87	52,73	53,44	54,18	52,76			
4	5,93	6,21	6,05	5,99	6,28	6,35	6,71			
2	13,38	13,41	13,66	14,07	13,29	13,34	13,97			
5	26,19	25,84	25,86	25,81	25,63	25,06	25,60			
9	2,03	1,38	2,56	1,40	1,36	1,07	0,96			

de la mezcla y factores A-21978C (como sales sódicas) en pastilla  
 los dibujos que acompañan a esta memoria. La Tabla III contiene  
 una para cada uno de ellos.

TABLA III

de la mezcla y factores A-21978C

C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
3310	3310	3320	3300
3050	3040	3050	3045
2910	2910	2920	2910
2840	2835	2850	2840
1665	1650	1655	1650
1535	1535	1525	1525
1450	1450	1455	1445
1400	1395	1395	1390
1225	1225	1220	1215
1160	1160	1160	1155
1065	1060	1065	1055
745	745	740	735

1 Los pesos moleculares aproximados y las fórmulas moleculares de los tres factores A-21978C principales se encuentran en la Tabla IV.

TABLA IV

5

Factor A-21978C	Peso molecular	Fórmula
C <sub>0</sub>	1622	C <sub>72</sub> H <sub>100</sub> N <sub>16</sub> O <sub>27</sub>
C <sub>1</sub>	1636	C <sub>73</sub> H <sub>102</sub> N <sub>16</sub> O <sub>27</sub>
C <sub>2</sub>	1650	C <sub>74</sub> H <sub>104</sub> N <sub>16</sub> O <sub>27</sub>
C <sub>3</sub>	1664	C <sub>75</sub> H <sub>106</sub> N <sub>16</sub> O <sub>27</sub>
10 C <sub>4</sub>	1650	C <sub>74</sub> H <sub>104</sub> N <sub>16</sub> O <sub>27</sub>
C <sub>5</sub>	1664	C <sub>75</sub> H <sub>106</sub> N <sub>16</sub> O <sub>27</sub>

La Tabla V contiene los máximos de absorción del espectro de absorción ultravioleta de los tres factores A-21978C principales (sales sódicas) en etanol neutro.

TABLA V

Máximos UV (etanol neutro)

15

nm	E <sub>1</sub> <sup>1%</sup> 1 cm		
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
20 223	307	303	300
260	62	62	63
280	39	41	42
290	35	36	38
360	33	33	32

25 La Tabla VI contiene los datos de la valoración electro-métrica, determinados en dimetilformamida acuosa al 66 %, para los tres factores A-21978C principales y la mezcla A-21978C (en forma de sales sódicas).

30

TABLA VI

Valoración (DMF al 66 %)

A-21978C	Valores del pK <sub>a</sub> *
Factor C <sub>1</sub> **	5,7, 5,9; 7,2, 7,6
Factor C <sub>2</sub> **	5,8, 5,93; 7,6, 7,63
Factor C <sub>3</sub> **	5,73, 5,75; 7,54, 7,58
Mezcla	5,62; 7,16

\* Todos ellos contienen grupos menores a 11,5-12

\*\* Dos determinaciones.

Las rotaciones ópticas de los factores A-21978C (sales sódicas),  $[\alpha]_D^{25}$ , determinadas en agua, se encuentran en la Tabla VII.

TABLA VII

Rotaciones ópticas

Factor A-21978C	Rotación
C <sub>0</sub>	+11,9° (c 0,7, H <sub>2</sub> O)
C <sub>1</sub>	+16,9° (c 0,7, H <sub>2</sub> O)
C <sub>2</sub>	+18,6° (c 0,9, H <sub>2</sub> O)
C <sub>3</sub>	+20,9° (c 0,4, H <sub>2</sub> O)
C <sub>4</sub>	+14,8° (c 0,7, H <sub>2</sub> O)
C <sub>5</sub>	+17,9° (c 0,7, H <sub>2</sub> O).

Los factores A-21978C pueden ser separados por cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC), utilizando las siguientes condiciones:

Columna : vidrio, 1 x 21 cm

Relleno : gel de sílice/C<sub>18</sub> (Quantum LP-1)

Disolvente: agua:metanol:acetonitrilo (95:30:75) conteniendo 0,2 % de ácido acético y 0,2 % de piridina

Detector : UV a 285 nm

1 Presión: 100 psi.

Los tiempos de retención para los factores A-21978C (sales sódicas) se encuentran en la Tabla VIII.

TABLA VIII

Tiempos de retención en HPLC

5

<u>Factor A-21978C</u>	<u>Tiempo (minutos)</u>	<u>Bioanálisis (Micrococcus luteus) (unidades/mg)</u>
C <sub>0</sub>	6	966
C <sub>1</sub>	8	1663
10 C <sub>4</sub>	9	1410
C <sub>2</sub>	13	1390
C <sub>5</sub>	14	1246
C <sub>3</sub>	19	803

15 La mezcla A-21978C puede ser separada y distinguida del A-21978 factores A, B, D y E empleando cromatografía en capa fina (TLC) de gel de sílice. El sistema disolvente preferido es acetonitrilo:agua (3:1) y la bioautografía con Micrococcus luteus es un método de detección preferido. Los valores aproximados de R<sub>F</sub> de estos factores A-21978 (en forma de sales sódicas) se encuentran en la Tabla IX.

20

TABLA IX

<u>Factor A-21978</u>	<u>R<sub>F</sub></u>
A	0,66
25 B	0,57
C mezcla	0,31
D	0,51
E	0,48

30 La mejor forma de separar y distinguir entre sí los factores de la mezcla A-21978C es la TLC en gel de sílice de fa-

1 se inversa (Quantum, C<sub>18</sub>). Un sistema disolvente preferido  
es agua:metanol:acetonitrilo (45:15:40) que contiene 0,2 %  
de piridina y 0,2 % de ácido acético. Puede utilizarse para  
5 la detección luz ultravioleta de onda larga (365 nm). Los  
valores aproximados de R<sub>f</sub> de los factores A-21978C (en forma  
de sales sódicas) en este sistema se encuentran en la Ta-  
bla X.

TABLA X

<u>Factor A-21978C</u>	<u>R<sub>f</sub></u>
C <sub>0</sub>	0,71
C <sub>1</sub>	0,64
C <sub>2</sub>	0,56
C <sub>3</sub>	0,47
15 C <sub>4</sub>	0,63
C <sub>5</sub>	0,53

Los factores A-21978C y la mezcla A-21978C son estables  
en soluciones a pH de 2 a 9 a 5°C y 25°C durante 7 días como  
mínimo. Son inestables a pH 11 al cabo de 4 horas (inactiva-  
20 ción total) tanto a 5°C como a 25°C.

El A-21978C y las mezclas A-21978C y los factores indivi-  
duales C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> del A-21978C son capaces de  
formar sales. Estas sales también forman parte de esta in-  
vención. Estas sales son útiles, por ejemplo, para separar  
25 y purificar las mezclas y los factores individuales. Además,  
las sales farmacéuticamente aceptables son especialmente úti-  
les. Las sales "farmacéuticamente aceptables" son aquéllas  
donde la toxicidad del compuesto en su conjunto para los ani-  
males de sangre caliente no es mayor que la de la forma no  
30 salina..

1           Se observará que los antibióticos A-21978 contienen  
hasta cinco grupos carboxilo libres que pueden formar sales.  
Por lo tanto, se consideran parte de esta invención las sa-  
les parciales, mixtas y complejas. En la preparación de es-  
5           tas sales deben evitarse los valores del pH superiores a 10  
debido a la inestabilidad de los antibióticos a estos niveles.

          Los antibióticos A-21978 también contienen dos grupos  
amino libres y, por lo tanto, pueden formar monosales o disa-  
les de adición de ácidos.

10           Las sales farmacéuticamente aceptables de metales alcali-  
linos, metales alcalino-térreos y aminas y las sales de adi-  
ción de ácido son especialmente útiles. Son sales de metales  
alcalinos y alcalino-térreos de los antibióticos A-21978,  
representativas y adecuadas, las de sodio, potasio, litio,  
15           cesio, rubidio, bario, calcio y magnesio. Entre las sales  
amónicas adecuadas de los antibióticos A-21978 se encuentran  
las de amonio y las de alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio y hidroxialquil-  
(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)amonio primario, secundario y terciario. Son sales  
amónicas ilustrativas las formadas por reacción de un anti-  
20           biótico A-21978 con hidróxido amónico, metilamina, sec-butil-  
amina, isopropilamina, dietilamina, diisopropilamina, etanol-  
amina, trietilamina, 3-amino-1-propanol y similares.

          Las sales catiónicas de metales alcalinos y alcalino-  
térreos de los antibióticos A-21978 se preparan por los pro-  
25           cedimientos comúnmente utilizados para la preparación de sa-  
les catiónicas. Por ejemplo, se disuelve la forma ácida libre  
del A-21978C factor C<sub>1</sub> en un disolvente adecuado como meta-  
nol o etanol caliente; se agrega a esta solución una solución  
que contiene la cantidad estequiométrica de la base inorgáni-  
30           ca deseada en metanol acuoso. La sal así formada puede ser

1 aislada por métodos rutinarios, como filtración o evaporación del disolvente.

5 Las sales formadas con aminas orgánicas pueden ser preparadas de forma similar. Por ejemplo, la amina líquida o gaseosa puede agregarse a una solución de A-21978C factor C<sub>1</sub> en un disolvente adecuado como acetona; el disolvente y el exceso de amina pueden ser separados por evaporación.

10 Entre las sales de adición de ácidos de los antibióticos A-21978, representativas y adecuadas, se encuentran las sales formadas por reacciones comunes con ácidos orgánicos e inorgánicos como, por ejemplo, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, succínico, cítrico, láctico, maleico, fumárico, palmítico, cólico, pamoico, mícico, D-glutámico, d-canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, 15 esteárico, salicílico, metanosulfónico, bencenosulfónico, sórbico, pícrico, benzoico, cinámico y similares.

20 En farmacia veterinaria es sabido que la forma de un antibiótico no es normalmente de gran importancia cuando se trata un animal con el antibiótico. En la mayoría de los casos, las condiciones que reinan dentro del animal modifican el fármaco a una forma distinta de aquella en la que es administrado. La forma salina en la que puede ser administrado, por lo tanto, no es de gran importancia. Sin embargo, la forma salina puede ser elegida por razones de economía, comodidad y toxicidad.

25

#### EL MICROORGANISMO

30 El microorganismo de esta invención fué estudiado y caracterizado por Frederick P. Mertz y Ralph E. Kastner de los Lilly Research Laboratories.

30

El nuevo organismo útil para la preparación de los anti-

1 bióticos A-21978C fué aislado de una muestra de tierra reco-  
gida en el Monte Ararat, Turquía. Este organismo se ha cla-  
sificado como una nueva cepa de Streptomyces roseosporus,  
Falcão de Morias y Daliá Maia 1961. Esta clasificación se  
5 basa en una comparación con las descripciones publicadas  
[R.E. Buchanan y N.E. Gibbons, "Bergey's Manual of Determi-  
native Bacteriology", The Williams and Wilkins Company,  
octava edición, 1974 y E.B. Shirling y D. Gottlieb, "Coopera-  
tive Description of Type Strains of Streptomyces", Intern.  
10 Journal of Systematic Bacteriol., 808-809 (1972)].

Esta clasificación se basa en los métodos recomendados  
para el International Streptomyces Project [E.B. Shirling y  
D. Gottlieb, "Methods of Characterization of Streptomyces  
Species", Intern. Journal of Systematic Bacteriol. 16, 313-  
15 340 (1966)], junto con ciertos ensayos suplementarios. La  
utilización de carbono fué determinada sobre medio basal  
ISP #9 al que se agregaron fuentes de carbono hasta igualar  
a una concentración final del 1,0 %. Las fuentes de carbono  
fueron esterilizadas por filtración; el medio basal fué es-  
20 terilizado en autoclave. Las placas se leyeron al cabo de  
14 días de incubación a 30°C. Los azúcares de la pared celu-  
lar se determinaron utilizando una modificación del procedi-  
miento de Lechevalier (M.P. Lechevalier, "Chemical Methods  
as Criteria for the Separation of Actinomycetes into Genera",  
25 trabajo patrocinado por el Subcomité Actinomycetes de la  
American Society of Microbiology, Dr. Thomas G. Pridham,  
Convenor; realizado en el Institute of Microbiology, Rutgers  
University, The State University of New Jersey, New Brunswick,  
New Jersey, 1971). El isómero del ácido diaminopimélico fué  
30 determinado utilizando el método de Becker y colaboradores

1 [B. Becker y colaboradores, "Rapid Differentiation Between  
Nocardia and Streptomyces by Paper Chromatography of Whole  
Cell Hydrolysates", Appl. Microbiol. 11, 421-423 (1964)].

5 Los aminoácidos se determinaron con fragmentos de paredes  
celulares lavadas. Los pigmentos melanoides se determinaron  
utilizando ISP #1 (caldo de triptona-extracto de levadura),  
ISP #6 (agar de peptona-extracto de levadura hierro), ISP  
#7 (agar tirosina), ISP #7 modificado (ISP #7 sin tirosina)  
y un análisis con tirosina [Yuzuru Mikami y colaboradores,  
10 "Modified Arai and Mikami Melanin Formation Test of Strepto-  
myces", Intern. Journal of Systematic Bacteriol. 27 (3),  
290 (1977)]. La hidrólisis del almidón fué determinada me-  
diante análisis de la presencia de almidón con yodo.

15 El intervalo de temperatura, la tolerancia al NaCl,  
la región de pH y la sensibilidad antibiótica fueron reali-  
zados utilizando un medio de agar ISP #2. Las temperaturas  
fueron las siguientes: 25, 28, 30, 34, 37, 40, 45, 50 y 55°C.  
La tolerancia al NaCl fué medida agregando NaCl al agar en  
las siguientes proporciones: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y  
20 12 %. En este caso la incubación se realizó a 30°C. La región  
de pH se midió ajustando el agar desde pH 3,0 a pH 11,0 por  
incrementos de 1,0 unidades de pH, inmediatamente antes de  
verter. La sensibilidad a los antibióticos se determinó uti-  
lizando discos de sensibilidad colocados sobre placas de agar  
25 sembradas.

30 Se asignaron los colores de acuerdo con el método ISCC-  
NBS (K.L. Kelly y D.B. Judd, "The ISCC-NBS Methods of Desig-  
nating Colors and a Dictionary of Color Names", Departamento  
de Comercio de Estados Unidos, Circular 553, Washington, D.C.  
1955).

1 Las cifras entre paréntesis se refieren a la serie de  
colores Tresner y Backus [H.D. Tresner y E.J. Backus,  
"System of Color Wheels for Streptomyces Taxonomy", Appl.  
Microbiol. 11, 335-338 (1956)]. Las designaciones de la ta-  
5 bla de colores están subrayadas. Los bloques de color de  
Maerz y Paul están entre corchetes (A. Maerz y M.R. Paul,  
"Dictionary of Color", Mc Graw-Hill Book Company, Inc.,  
New York, N.Y., 1950).

CARACTERIZACION DE LA CEPA PRODUCTORA DE A-21978

10 Morfología

La morfología del cultivo A-21978.6, que es el cultivo  
que produce los antibióticos A-21978, está constituida por  
esporóforos que se clasifican como Rectus-Flexibilis (RF).  
Las cadenas de esporas contienen más de diez esporas por  
15 cadena. La superficie de las esporas es lisa.

El cultivo A-21978.6 se caracteriza por la producción  
de una masa de esporas aéreas de color predominantemente  
rojo, con un color del reverso marrón rojizo. También hay  
presente un pigmento soluble en agua marrón pálido. Estas  
20 características son exhibidas sobre tres de los catorce me-  
dios de cultivo en placas de agar (ISP #2, ISP #7, TPO). Es-  
tos tres medios son los únicos que soportan un crecimiento  
aéreo y vegetativo abundante.

Dos medios de cultivo en placas de agar, ISP #4 y agar  
25 glucosa-asparagina, produjeron una masa de esporas aéreas  
de color blanco a gris, con un color del reverso amarillo.  
No se observó ningún pigmento soluble en agua. Estos dos  
medios soportaban un buen crecimiento aéreo y vegetativo,  
aunque no abundante.

30 Se utilizaron otros nueve medios de cultivo en placas

1 de agar, pero el crecimiento y la esporulación en los mismos oscilaban entre escasos y nulos. El color aéreo, cuando estaba presente, aunque escaso, era de la serie de blanco a gris.

5 No había pigmentos melanoideos. Los constituyentes principales de la pared celular son: LL-DAP, glicina, glucosa y ribosa. Esto indica una pared celular de Tipo I y un esquema de azúcares tipo C (R.E. Buchanan y N.E. Gibbons, Editores, "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology",  
10 The Williams & Wilkins Company, octava edición, 1974, pág. 658).

Se compararon los cinco cultivos siguientes en ensayos de laboratorio con el A-21978.6:

- 15 Streptomyces albovinaceus ISP 5136; ATCC 15833  
Streptomyces candidus ISP 5141; ATCC 19891  
Streptomyces moderatus ISP 5529; ATCC 23443  
Streptomyces roseosporus ISP 5122; ATCC 23958  
Streptomyces setonii ISP 5395; ATCC 25497.

20 Estos cultivos pertenecen a la serie de color blanca y roja, presentan una morfología de los esporóforos del tipo RF, ornamentación superficial de esporas lisas y, de acuerdo con las descripciones ISP, son melanina-negativos y no presentan un color neto del reverso ni pigmentos solubles en agua. Estas características, junto con el diagrama de  
25 utilización de carbono y otras características secundarias, concuerdan con las del cultivo A-21978.6.

30 Cuando estos cultivos se compararon con A-21978.6 en condiciones de laboratorio, cuatro de ellos fueron rechazados. S. candidus y S. setonii presentaban una masa amarilla de esporas aéreas en muchos medios, difiriendo en ésto del

1 cultivo A-21978.6. S. albovinaceus y S. moderatus presenta-  
ban un color neto oscuro del reverso, pigmentos solubles en agua y producían pigmentos melanoideos, todo lo  
5 cual difiere del cultivo A-21978.6. La descripción de S. moderatus se refiere a un color del reverso marrón rojizo o  
marrón intenso pero no se refiere a esta característica para  
el S. albovinaceus. Ningún cultivo ha sido citado como me-  
lanina-positivo.

10 Por lo tanto, el cultivo A-21978.6 fué clasificado como  
una cepa de Streptomyces roseosporus, Falcão de Morias y  
Daliá Maia 1961. Esta clasificación estaba basada en la com-  
paración con las descripciones publicadas y comparaciones  
directas en laboratorio. Las siguientes características del  
cultivo resumen los estudios comparativos directos.

15 CARACTERISTICAS DEL CULTIVO

Morfología

A-21978.6

S. roseosporus

20 Esporóforos rectos a flexuosos (RF), sin ganchos, bu-  
cles ni espirales observados. Cadenas de más de 10 esporas.  
Superficie de las esporas lisa, determinada por microscopía  
electrónica de barrido.

Esporas: oblongas a ovales

Oblongas a cilíndricas

Promedio: 0,85 x 1,78  $\mu$ M

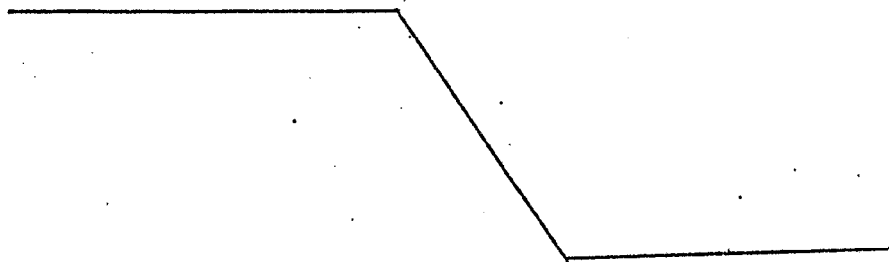
1,01 x 2,47  $\mu$ M

Límites : 0,65-0,97 x 0,97-2,6  $\mu$ M

0,97-1,3 x 1,63-3,25  $\mu$ M

25

30





		<u>CARACTERISTICAS DE CULTIVO (con</u>			
		<u>A-21978.6</u>			
		<u>Crecimiento</u>	<u>Color</u>	<u>Trozos de zanahoria</u>	<u>Creci</u>
1					
5	Aéreo :	bueno	gris c̄ rosa	Trozos de zanahoria	nu
	Vegetativo:	abundante	marrón		bu
		sin pigmento soluble			
				<u>Trozos de patata</u>	
10	Aéreo :	bueno	gris c̄ rosa	Trozos de patata	nu
	Vegetativo:	abundante	marrón		me
		pigmento soluble marrón oscuro			
				<u>ISP #1 (agar tripton-extracto de le</u>	
15	Aéreo :	mediano	(W) <u>a</u> blanco	ISP #1 (agar tripton- extracto de le	po
	Vegetativo:	bueno	[10A1] verde amarillento pálido		po
		sin pigmento soluble			
				<u>ISP #2 (agar levadura-extracto de</u>	
20	Aéreo :	abundante	(R) <u>5cb</u> rosa amarillento grisáceo	ISP #2 (agar levadura- extracto de	ab
	Vegetativo:	abundante	[5D10] marrón rojizo claro		ab
		pigmento soluble marrón claro			
				<u>ISP #3 (agar harina de avena)</u>	
25	Aéreo :	mediano	(W) <u>a</u> blanco	ISP #3 (agar harina de avena)	po
	Vegetativo:	mediano	[10A2] rosa amarillento pálido		me
		pigmento soluble marrón claro			
				<u>ISP #4 (agar almidón-sales inorgáni</u>	
30	Aéreo :	bueno	(W) <u>b</u> blanco	ISP #4 (agar almidón- sales inorgáni	bu
	Vegetativo:	bueno	[10B1] verde amarillento pálido		ab
		pigmento soluble marrón claro			

RACTERISTICAS DE CULTIVO (continuación)

S. roseosporus

	<u>Crecimiento</u>	<u>Color</u>
<u>Trozos de zanahoria</u>		
osa	nulo	ninguno
	bueno	marrón amarillento
	sin pigmento soluble	
<u>Trozos de patata</u>		
osa	nulo	ninguno
	mediano	marrón anaranjado
	sin pigmento soluble	
<u>P #1 (agar triptona-extracto de levadura)</u>		
co	pobre	(W) a blanco
amarillento pálido	pobre	[10B2] verde amarillento pálido
	sin pigmento soluble	
<u>P #2 (agar levadura-extracto de malta)</u>		
amarillento	abundante	(R) <u>3ca</u> amarillo anaranjado pálido
rojo claro	abundante	[12L7] marrón oliva claro
	pigmento soluble marrón claro	
<u>P #3 (agar harina de avena)</u>		
co	pobre	(W) a blanco
amarillento pálido	mediano	gris verdoso pálido
	sin pigmento soluble	
<u>P #4 (agar almidón-sales inorgánicas)</u>		
co	bueno	(R) <u>3c2</u> amarillo anaranjado pálido
amarillento pálido	abundante	[11I5] amarillo grisáceo
	sin pigmento soluble	

CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO (continuación)

	<u>A-21978.6</u>	<u>ISP #5 (agar glicero1-asparagina)</u>	<u>S: roseosporus</u>
	<u>Crecimiento</u>	<u>Crecimiento</u>	<u>Color</u>
1	Aéreo : mediano	(W) 13ba blanco pupúreo	(W)b blanco
5	Vegetativo: bueno	[3B7] rosa amarillento grisáceo	[10C2] amarillo grisáceo
		pigmento soluble rosa grisáceo	pigmento soluble marrón claro
		<u>ISP #7 (agar tirosina)</u>	
10	Aéreo : abundante (R)	5cb rosa amarillento grisáceo	(R) 5cb rosa amarillento grisáceo
	Vegetativo: abundante	[7L12] marrón rojizo moderado	[11E5] marrón amarillento
		pigmento soluble marrón oscuro	pigmento soluble marrón claro
		<u>Agar modificado de Bennett</u>	
15	Aéreo : ninguno		(R) 5cb rosa amarillento grisáceo
	Vegetativo: pobre	marrón amarillento pálido	[11D4] amarillo grisáceo
		sin pigmento soluble	pigmento soluble marrón claro
		<u>Agar malato cálcico</u>	
20	Aéreo : ninguno		(W) a blanco
	Vegetativo: mediano	[7L12] marrón rojizo moderado	verde amarillento pálido
		pigmento soluble marrón claro	pigmento soluble verde amarillento pálido
		<u>Agar solución de Czapek</u>	
25	Aéreo : pobre	(W) a blanco	-
	Vegetativo: pobre	blanquecino	-
		sin pigmento soluble	
		<u>Agar de Emerson</u>	
30	Aéreo : pobre		(R) 5cb rosa amarillento grisáceo
	Vegetativo: abundante	[13L6]	[11I5] amarillo grisáceo
		sin pigmento soluble	pigmento soluble marrón claro

	<u>CARACTERISTICAS DE CULTIVO (cont)</u>	
	<u>A-21978.6</u>	<u>ISP #5 (agar glicerol-asparagina)</u>
	<u>Crecimiento</u>	<u>Color</u>
1	Aéreo : mediano	(W) 13ba blanco pupúreo
5	Vegetativo: bueno	[3B7] rosa amarillento grisáceo
	pigmento soluble rosa grisáceo	
		<u>ISP #7 (agar tirosina)</u>
	Aéreo : abundante (R)	<u>5cb</u> rosa amarillento grisáceo
10	Vegetativo: abundante	[7L12] marrón rojizo moderado
	pigmento soluble marrón oscuro	
		<u>Agar modificado de Bennett</u>
	Aéreo : ninguno	-
15	Vegetativo: pobre	marrón amarillento pálido
	sin pigmento soluble	
		<u>Agar malato cálcico</u>
	Aéreo : ninguno	-
	Vegetativo: mediano	[7L12] marrón rojizo moderado
20	pigmento soluble marrón claro	
		<u>Agar solución de Czapek</u>
	Aéreo : pobre	(W) a blanco
	Vegetativo: pobre	blanquecino
	sin pigmento soluble	
25		<u>Agar de Emerson</u>
	Aéreo : pobre	-
	Vegetativo: abundante	[13L6]
	sin pigmento soluble	
30		

CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO (continuación)

			<u>S: roseosporus</u>	
		<u>Crecimiento</u>		<u>Color</u>
<u>#5 (agar glicerol-asparagina)</u>				
abundante		mediano	(W) <u>b</u>	blanco
abundante		buenc	[10C2]	amarillo grisáceo
				pigmento soluble marrón claro
<u>#7 (agar tirosina)</u>				
abundante		abundante	(R) <u>5cb</u>	rosa amarillento grisáceo
abundante		abundante	[11E5]	marrón amarillento
				pigmento soluble marrón claro
<u>agar modificado de Bennett</u>				
abundante		abundante	(R) <u>5cb</u>	rosa amarillento grisáceo
pálido		abundante	[11D4]	amarillo grisáceo
				pigmento soluble marrón claro
<u>agar malato cálcico</u>				
abundante		pobre	(W) <u>a</u>	blanco
abundante		pobre		verde amarillento pálido
				pigmento soluble verde amarillento pálido
<u>agar solución de Czapek</u>				
		ninguno		-
		ninguno		-
<u>agar de Emerson</u>				
abundante		abundante	(R) <u>5cb</u>	rosa amarillento grisáceo
abundante		abundante	[11I5]	amarillo grisáceo
				pigmento soluble marrón claro

CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO (continuación)

		<u>S. roseosporus</u>	
	<u>A-21978.6</u>	<u>Crecimiento</u>	<u>Color</u>
		<u>Agar glucosa-asparagina</u>	
Aéreo :	bueno	mediano	(W)b blanco
Vegetativo:	bueno	bueno	[12B2] verde amarillento pálido
	sin pigmento soluble		sin pigmento soluble
		<u>Agar glicerol-glicina</u>	
Aéreo :	pobre	abundante	(W)b blanco
Vegetativo:	abundante	abundante	[10G3] amarillo claro
	pigmento soluble marrón		pigmento soluble marrón claro
		<u>Agar nutriente</u>	
Aéreo :	ninguno	mediano	(W)b blanco
Vegetativo:	pobre	bueno	gris amarillento pálido
	sin pigmento soluble		sin pigmento soluble
		<u>(Agar pasta de tomate-harina de avena)</u>	
Aéreo :	abundante	abundante (R)5cb	rosa amarillento grisáceo
Vegetativo:	abundante	abundante [12L7]	marrón amarillento
	pigmento soluble marrón		pigmento soluble marrón

1

5

10

15

20

25

30

1

CARACTERISTICAS DE CULTIVO (continua)

A-21978.6

Crecimiento

Color

Crec

Agar glucosa-asparagina

5

Aéreo :	bueno	(W)b blanco	me
Vegetativo:	bueno	[12B2] amarillo grisáceo	bu

sin pigmento soluble

Agar glicerol-glicina

10

Aéreo :	pobre	-	ab
Vegetativo:	abundante	[8L12] marrón grisáceo oscuro	ab

pigmento soluble marrón

Agar nutriente

15

Aéreo :	ninguno	-	me
Vegetativo:	pobre	gris amarillento pálido	bu

sin pigmento soluble

(Agar pasta de tomate-harina de ave)

20

Aéreo :	abundante	(R)5cb rosa amarillento grisáceo	
Vegetativo:	abundante	[8L12] marrón grisáceo oscuro	

pigmento soluble marrón

25

30

CAS DE CULTIVO (continuación)

S. roseosporus

<u>Color</u>	<u>Crecimiento</u>	<u>Color</u>
<u>rosa-asparagina</u>		
blanco	mediano	(W)b blanco
amarillo grisáceo	bueno	[12B2] verde amarillento pálido
	sin pigmento soluble	
<u>cerol-glicina</u>		
	abundante	(W)b blanco
marrón grisáceo oscuro	abundante	[10G3] amarillo claro
blanco	pigmento soluble marrón claro	
<u>nutriente</u>		
	mediano	(W) <u>b</u> blanco
amarillento pálido	bueno	gris amarillento pálido
	sin pigmento soluble	
<u>ta de tomate-harina de avena)</u>		
rosa amarillento grisáceo	abundante (R) <u>5cb</u>	rosa amarillento grisáceo
grisáceo oscuro	abundante [12L7]	marrón amarillento
	pigmento soluble marrón	

1

Utilización de carbono

<u>Substrato</u>	<u>A-21978.6</u>	<u>S. roseosporus</u>
L-Arabinosa	+	+
D-Fructosa	+	-
5 D-Galactosa	+	+
D-Glucosa	+	+
i-Inositol	-	-
D-Manitol	+	-
D-Rafinosa	-	-
10 L- Ramnosa	+	+
Salicina	+	+
Sacarosa	-	-
D-Xilosa	+	+

Clave:

15

+ = utilización positiva

- = utilización negativa.

20

<u>Características</u>	<u>A-21978.6</u>	<u>S. roseosporus</u>
<u>Pigmentos melanoides</u>		
ISP #1 (triptona-extracto de levadura)	-	-
ISP #6 (peptona-extracto de levadura-hierro)	-	-
ISP #7 (agar tirosina)	-	-
ISP #7 mod. (ISP #7 menos tirosina)	-	-
Análisis de tirosina	-	-
25 Licuefacción de la gelatina	+	+
Acción sobre la leche descremada	ligera hidrólisis	ligera hidrólisis
Hidrólisis del almidón	+	+
Región de pH	5-11	5-11
Límites de temperatura	25-40°C	25-45°C
30 Reducción de nitratos	-	+
Tolerancia al NaCl; crecimiento hasta	10%	6%

1

Sensibilidad a los antibióticos

<u>Antibiótico</u>	<u>Concentración/disco</u>	<u>Clase</u>	<u>A-21978.6</u>	<u>S.roseosporus</u>
Eritromicina	15 µg	macrolida	+	+
5 Cefalotina	30 µg	β-Lactama	+	+
Lincomicina	2 µg	Glicósido	-	-
Nistatina	100 unidades	Polieno	-	-
Polimixina B	300 unidades	Péptido	+	-
Estreptomina	10 µg	Aminoglicósido	+	+
10 Tetraciclina	30 µg	Tetraciclina	+	+
Vancomicina	30 µg	Glicopéptido	+	+

+ = sensible (zonas de inhibición)

- = resistente (sin zonas de inhibición)

15

Ciertas características de la cepa S. roseosporus NRRL 11379 productora de A-21978 difieren de las características publicadas para el S. roseosporus. El cultivo A-21978.6 difiere de la cepa publicada en tamaño de las esporas, crecimiento en trozos de zanahoria y patata, tolerancia al NaCl y reducción de nitratos.

20

El cultivo de Streptomyces roseosporus útil para la producción de los antibióticos A-21978 ha sido depositado y forma parte de la colección de cultivos de reserva del Northern Regional Research Center, Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Agricultural Research Service, Peoria, Illinois, 61604, donde está a disposición del público bajo el número NRRL 11379.

25

30

Como ocurre con otros organismos, las características del cultivo productor de A-21978, Streptomyces roseosporus NRRL 11379, están sometidas a variaciones. Por ejemplo, pueden obtenerse variantes y mutantes artificiales de la cepa NRRL 11379

1 por tratamiento con diversos mutágenos conocidos como rayos  
ultravioleta, rayos X, ondas de alta frecuencia, radiacio-  
nes radiactivas y productos químicos. Todos los variantes  
y mutantes naturales y artificiales de Streptomyces roseos-  
5 porus NRRL 11379 que producen los antibióticos A-21978 pue-  
den ser utilizados en esta invención.

El medio de cultivo utilizado para desarrollar el Strep-  
tomyces roseosporus NRRL 11379 puede ser cualquiera de los  
diversos medios conocidos. Por razones de economía de pro-  
10 ducción, rendimiento óptimo y facilidad de aislamiento del  
producto, sin embargo, se prefieren ciertos medios de culti-  
vo. Así, por ejemplo, una fuente de carbono preferida en la  
fermentación a gran escala es la dextrina de tapioca, aunque  
también puede utilizarse glucosa, fructosa, galactosa, mal-  
15 tosa, manosa, aceite de semilla de algodón, oleato de meti-  
lo, glicerol, aceite de soja refinado y similares. Una fuen-  
te de nitrógeno preferida es la caseína hidrolizada por enzi-  
mas, aunque también son útiles la peptona de carne soluble,  
la harina de soja, el hidrolizado de soja, el salvado de so-  
20 ja, la levadura, los aminoácidos como L-asparagina y DL-leu-  
cina y similares. Las sales inorgánicas nutrientes que pueden  
ser incorporadas a los medios de cultivo son las sales solu-  
bles capaces de formar iones potasio, amonio, cloruro, sulfato,  
nitrato y similares. Entre éstas, es especialmente útil  
25 el sulfato potásico para la producción del antibiótico. Tam-  
bién son útiles las cenizas de melazas, los dializados de  
cenizas y las mezclas minerales sintéticas.

Para la producción de los antibióticos A-21978 es preferi-  
ble utilizar agua destilada o desionizada en el medio de fer-  
30 mentación. Algunos de los minerales presentes en el agua co-

1 rriente, por ejemplo el carbonato y el calcio, parecen inhi-  
bir la producción de antibiótico.

5 Los elementos traza esenciales para el crecimiento y  
desarrollo del organismo también deben estar incluidos en  
el medio de cultivo. Estos elementos traza aparecen general-  
mente como impurezas de los otros constituyentes del medio,  
en cantidades suficientes para satisfacer los requisitos de  
crecimiento del organismo.

10 Puede ser necesario agregar a los medios de fermentación  
a gran escala pequeñas cantidades (v.g. 0,2 ml/l) de un agen-  
te antiespumante como polipropilenglicol, si la formación  
de espuma constituye un problema.

15 Para la producción de cantidades sustanciales de los  
antibióticos A-21978 se prefiere la fermentación aerobia  
sumergida en tanques. Pueden obtenerse pequeñas cantidades  
de los antibióticos A-21978 por cultivo en matraces sacu-  
didos. Debido al retraso temporal en la producción de anti-  
bióticos comúnmente asociada a la inoculación de grandes  
tanques con las esporas del organismo, es preferible utili-  
20 zar un inóculo vegetativo. El inóculo vegetativo se prepara  
inoculando un pequeño volumen del medio de cultivo con las  
esporas o con fragmentos miceliales del organismo para obte-  
ner un cultivo del organismo fresco y de crecimiento activo.  
Después el inóculo vegetativo se transfiere a un tanque  
25 mayor.

El organismo productor de A-21978 puede ser cultivado a  
temperaturas comprendidas entre 20° y 37°C aproximadamente.  
Al parecer la producción óptima de A-21978C ocurre a tempera-  
turas de unos 30-32°C.

30 Como es costumbre en los procesos de cultivo sumergido

1 aerobio, se dispersa aire estéril a través del medio de cul-  
tivo. Para conseguir una producción eficiente de los anti-  
bióticos A-21978, el porcentaje de saturación de aire para  
5 la producción en tanque debe ser superior al 20 %, preferi-  
blemente superior al 30 % (a 30°C y 1 atmósfera de presión).

Para la fermentación en tanque, es preferible mantener  
el valor del pH del medio de fermentación en una región  
comprendida entre 6,5 y 7,0 aproximadamente. Esto puede con-  
seguirse mediante la adición de cantidades apropiadas de,  
10 por ejemplo, hidróxido sódico (en las fases tempranas) y  
ácido clorhídrico (en las fases finales).

La producción de los antibióticos A-21978 puede ser  
seguida durante la fermentación mediante el análisis de mues-  
tras del caldo o de los extractos de los sólidos miceliales  
15 para determinar la actividad antibiótica frente a organis-  
mos que se sabe que son sensibles a los antibióticos. Un  
organismo útil para ensayar estos antibióticos es el  
Micrococcus luteus. El bioanálisis se realiza preferiblemen-  
te por análisis con discos de papel sobre placas de agar.

20 Después de su producción en condiciones de fermenta-  
ción aerobia sumergida, los antibióticos A-21978 pueden ser  
recuperados del medio de fermentación por métodos conocidos  
en este campo. La actividad antibiótica producida durante la  
fermentación de un organismo productor de A-21978 se encuen-  
25 tra generalmente en el caldo. Por lo tanto, la recuperación  
máxima de los antibióticos A-21978 se consigue mediante una  
filtración inicial para separar la masa micelial. El caldo  
filtrado puede ser purificado por diversas técnicas para  
30 dar la mezcla A-21978. Un método preferido implica la extrac-  
ción y precipitación para dar la mezcla A-21978.

1 La purificación y separación más avanzadas de la mezcla  
A-21978C y de los factores A-21978C individuales incluye  
procesos adicionales de adsorción y extracción. Los materia-  
les adsorbentes útiles para la purificación de la mezcla y  
5 factores A-21978C son: 1) resinas cambiadoras de anión - a)  
fuertemente básicas : poliestireno, BioRad AG 1 y 2, Bio-Rex,  
Dowex 1 y 2, Amberlite IRA 400, 401, 410; b) moderadamente  
básicas : epoxipoliamina, Bio-Rex 5 y Duolite A30B; c) débil-  
mente básicas: poliestireno o poliamina fenólica, Bio-Rad  
10 AG3, Duolite A-6, A-7, Amberlite IRA 68, IR-45, IR-4B; 2)  
gel de sílice; 3) florisil; 4) adsorbentes poliméricos (XAD-  
2 y 4); 5) polímero muy poroso (Diaion HP-20); 6) Sephadex  
G-10, G-25 y G-50; Bio-Gel P-2 y P-10; 7) resinas de fase  
invertida, gel de sílice/C<sub>18</sub> y gel de sílice/C<sub>8</sub>; 8) carbón;  
15 9) celulosa DEAE, Sephadex DEAE; 10) poliamida; 11) alúmina  
y 12) microcelulosa. Proveedores: Resinas Bio-Rad y Bio-Gel  
Bio Rad Laboratories, Richmond, Cal.; resinas Amberlite y  
XAD - Rohm and Haas Co., Philadelphia, Pa.,; resinas Duolite  
te - Diamond Shamrock Chemical Co., Redwood City, Cal.,;  
20 resinas Sephadex - Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala,  
Suecia; resinas Dowex - Dow Chemical Co., Midland, Mich.;  
Diaion - Mitsubishi Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japón;  
resinas XAD, gel de sílice/C<sub>18</sub> y gel de sílice/C<sub>8</sub> - E. Merck,  
Darmstadt, Alemania.

25 Alternativamente, pueden utilizarse los sólidos del cul-  
tivo, incluidos los constituyentes del medio y el micelio,  
sin extracción ni separación pero, preferiblemente, después  
de separar el agua, como fuente de los antibióticos A-21978.  
Por ejemplo, después de la producción de la actividad anti-  
30 biótica A-21978, el medio de cultivo puede ser secado por

1 liofilización y mezclado directamente en la premezcla de ali-  
mentación.

5 La mezcla A-21978C y los factores individuales A-21978C  
utilizados en los ensayos aquí descritos se encontraban siem-  
pre en forma de sal sódica.

10 Las mezclas A-21978 y A-21978C y los factores antibióti-  
cos individuales A-21978C C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> inhiben  
el crecimiento de ciertos organismos patógenos, especialmen-  
te de las bacterias Gram-positivas. Las concentraciones mí-  
nimas de inhibición (CMI) a las cuales los factores A-21978C  
y la mezcla A-21978C inhiben a ciertas bacterias selecciona-  
das, determinadas mediante ensayos normales de dilución en  
agar, se encuentran en la Tabla XI.

15

20

25

30

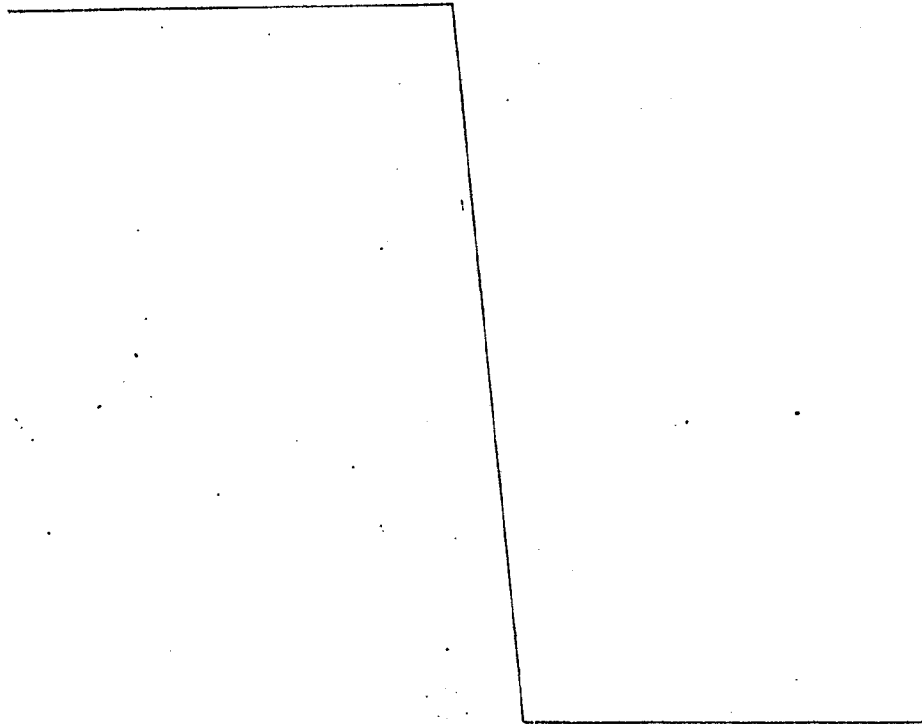


TABLA XI

Organismo (aerobio)	Mezcla	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	0,13	1,0	0,5	0,13	0,06	0,25	0,13
<u>Streptococcus</u> 282 Grupo D	0,25	2,0	1,0	0,25	0,13	1,0	0,13
<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	0,13	0,25	0,13	0,13	0,25	0,13	0,06
<u>Streptococcus pneumoniae</u> Park I	0,13	0,5	0,13	0,25	0,13	0,5	0,06
<u>Streptococcus</u> 9943 Viridans	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,13
<u>Neisseria gonorrhoeae</u> 111076-4	8,0	NE*	16,0	4,0	4,0	NE	NE

\* NE = No ensayado

Las concentraciones mínimas de inhibición a las cuales la mezcla A-21978C y los principales factores A-21978C inhiben a ciertas bacterias seleccionadas, determinadas mediante ensayos normales de dilución en caldo, se encuentran en la Tabla XII.

TABLA XII

Organismo (aerobio)	Mezcla	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	0,25	1,0	1,5	0,13
<u>Streptococcus</u> 282 Grupo D	0,25	2,0	1,0	0,13
<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	0,13	0,5	0,25	0,13
<u>Streptococcus pneumoniae</u> Park I	0,5	2,0	1,0	0,5
<u>Streptococcus</u> 9943 Viridans	8,0	32,0	16,0	32,0

1

TABLA XI

	Organismo (aerobio)	Mezcla	CMI (µg/		
			C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
	<u>Staphilococcus aureus</u> 3055	0,13	1,0	0,5	0,1
5	<u>Streptococcus</u> 282 Grupo D	0,25	2,0	1,0	0,2
	<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	0,13	0,25	0,13	0,1
	<u>Streptococcus pneumoniae</u> Park I	0,13	0,5	0,13	0,2
	<u>Streptococcus</u> 9943 Viridans	0,5	1,0	0,5	1,0
10	<u>Neisseria gonorrhoeae</u> 111076-4	8,0	NE*	16,0	4,0
	* NE = No ensayado				

Las concentraciones mínimas de inhibición a las cuales la mezcla A-  
inhiben a ciertas bacterias seleccionadas, determinadas mediante ensayo  
cuentran en la Tabla XII.

15

TABLA XII

	Organismo (aerobio)	Mezcla
	<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	0,25
	<u>Streptococcus</u> 282 Grupo D	0,25
20	<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	0,13
	<u>Streptococcus pneumoniae</u> Park I	0,5
	<u>Streptococcus</u> 9943 Viridans	8,0

25

30

TABLA XI

Mezcla	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	<u>C<sub>0</sub></u>	<u>C<sub>1</sub></u>	<u>C<sub>2</sub></u>	<u>C<sub>3</sub></u>	<u>C<sub>4</sub></u>	<u>C<sub>5</sub></u>
0,13	1,0	0,5	0,13	0,06	0,25	0,13
0,25	2,0	1,0	0,25	0,13	1,0	0,13
0,13	0,25	0,13	0,13	0,25	0,13	0,06
0,13	0,5	0,13	0,25	0,13	0,5	0,06
0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,13
3,0	NE*	16,0	4,0	4,0	NE	NE

En a las cuales la mezcla A-21978C y los principales factores A-21978C  
determinadas mediante ensayos normales de dilución en caldo, se en-

TABLA XII

Mezcla	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	<u>C<sub>1</sub></u>	<u>C<sub>2</sub></u>	<u>C<sub>3</sub></u>
0,25	1,0	1,5	0,13
0,25	2,0	1,0	0,13
0,13	0,5	0,25	0,13
0,5	2,0	1,0	0,5
8,0	32,0	16,0	32,0

1 En un aspecto importante, los antibióticos A-21978C inhiben el crecimiento de los organismos que son resistentes a otros antibióticos. La Tabla XII contiene los valores de la CMI por dilución con agar de los factores C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> del A-21978C contra organismos representativos, utilizando técnicas de dilución en agar ICS.

5

Organismo de ensayo*	TABLA XIII	
	A-21978C <sub>0</sub>	A-21978C <sub>1</sub>
<u>Staphylococcus aureus</u> (10)	1,0 [10]	0,5 [10]
<u>Staphylococcus epidermidis</u> (12)	1-2 [12]	0,13-0,25 [9]
<u>Streptococcus pyogenes</u> (7)	0,25-5 [5], 32,>32	0,12 [5], 8, 16
Grupo D <u>Streptococcus</u> (9)	2-4 [8], >32	1-2 [8], >16
<u>Streptococcus pneumoniae</u> (8)	0,13-1,0 [7], 4	0,12-1 [7], 8
<u>Viridans Streptococcus</u> (2)	1-4 [2]	0,5, 8
<u>Neisseria gonorrhoeae</u> (11)	NE***	16->128 [11]
Organismo de Ensayo*	A-21978C <sub>3</sub>	A-21978C <sub>4</sub>
<u>Staphylococcus aureus</u> (10)	0,06-0,12 [10]	0,25-0,5 [10]
<u>Staphylococcus epidermidis</u> (12)	0,06-0,25 [11], 1	0,25-1,0 [12]
<u>Streptococcus pyogenes</u> (7)	0,06-0,25 [6], 8	0,13 [5], 16, 32
Grupo D <u>Streptococcus</u> (9)	0,12-0,5 [8], 4	0,5-1,0 [8], 32
<u>Streptococcus pneumoniae</u> (8)	0,06-0,25 [7], 4	0,5 [7], 2
<u>Viridans Streptococcus</u> (2)	0,5 [2]	1, 2 [2]
<u>Neisseria gonorrhoeae</u> (11)	4->128 [9]	NE***
Organismo de Ensayo*	A-21978C <sub>2</sub>	A-21978C <sub>5</sub>
<u>Staphylococcus aureus</u> (10)	0,12-0,25 [10]	0,06-0,25 [10]
<u>Staphylococcus epidermidis</u> (12)	0,13-0,25 [9], 0,5	0,13-0,5 [12]
<u>Streptococcus pyogenes</u> (7)	0,06-0,12 [5], 4, 8	0,06 [5], 4, 16
Grupo D <u>Streptococcus</u> (9)	0,25-0,5 [8], 8	0,13-0,25 [8], >32
<u>Streptococcus pneumoniae</u> (8)	0,12 [5], 0,5, 4 [2]	0,06 [7], 2
<u>Viridans Streptococcus</u> (2)	0,5, 4	0,13-0,25 [2]
<u>Neisseria gonorrhoeae</u> (11)	4->128 [11]	NE

\* El número entre paréntesis es igual al número de aislados ensayados

\*\* El número entre corchetes es igual al número de aislados con este valor o valores de la CMI; cuando no hay ningún número entre corchetes, solamente un aislado tiene este valor de la CMI.

\*\*\* NE = No ensayado.

1 En un aspecto importante, los antibióticos A-21978C inhiben el cre-  
sistentes a otros antibióticos. La Tabla XII contiene los valores de la  
res C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> del A-21978C contra organismos representativos,  
ICS.

5

TABLA XIII  
A-21978C<sub>0</sub>

Organismo de ensayo*	A-21978C <sub>0</sub>
<u>Staphylococcus aureus</u> (10)	1,0 [10]
<u>Staphylococcus epidermidis</u> (12)	1-2 [12]
<u>Streptococcus pyogenes</u> (7)	0,25-5 [5], 32,>32
10 Grupo D <u>Streptococcus</u> (9)	2-4 [8], >32
<u>Streptococcus pneumoniae</u> (8)	0,13-1,0 [7], 4
Viridans <u>Streptococcus</u> (2)	1-4 [2]
<u>Neisseria gonorrhoeae</u> (11)	NE***
Organismo de Ensayo*	A-21978C <sub>3</sub>
<u>Staphylococcus aureus</u> (10)	0,06-0,12 [10]
<u>Staphylococcus epidermidis</u> (12)	0,06-0,25 [11], 1
<u>Streptococcus pyogenes</u> (7)	0,06-0,25 [6], 8
Grupo D <u>Streptococcus</u> (9)	0,12-0,5 [8], 4
20 <u>Streptococcus pneumoniae</u> (8)	0,06-0,25 [7], 4
Viridans <u>Streptococcus</u> (2)	0,5 [2]
<u>Neisseria gonorrhoeae</u> (11)	4->128 [9]

15

20

\* El número entre paréntesis es igual al número de aislados ensayados

\*\* El número entre corchetes es igual al número de aislados con este va-  
ningún número entre corchetes, solamente un aislado tiene este valc

25

\*\*\* NE = No ensayado.

30

os A-21978C inhiben el crecimiento de los organismos que son re-  
contiene los valores de la CMI por dilución con agar de los facto-  
rganismos representativos, utilizando técnicas de dilución en agar

TABLA XIII

<u>A-21978C<sub>0</sub></u>	<u>A-21978C<sub>1</sub></u>	<u>A-21978C<sub>2</sub></u>
1,0 [10]	0,5 [10]	0,12-0,25 [10]
1-2 [12]	0,13-0,25 [9]	0,13-0,25 [9], 0,5
0,25-5 [5], 32,>32	0,12[5], 8, 16	0,06-0,12[5], 4, 8
2-4[8],>32	1-2[8],>16	0,25-0,5[8], 8
0,13-1,0 [7], 4	0,12-1[7], 8	0,12[5], 0,5, 4 [2]
1-4 [2]	0,5,8	0,5, 4
NE***	16->128 [11]	4->128 [11]
<u>A-21978C<sub>3</sub></u>	<u>A-21978C<sub>4</sub></u>	<u>A-21978C<sub>5</sub></u>
0,06-0,12 [10]	0,25-0,5 [10]	0,06-0,25 [10]
0,06-0,25 [11], 1	0,25-1,0 [12]	0,13-0,5 [12]
0,06-0,25 [6], 8	0,13 [5], 16, 32	0,06 [5], 4, 16
0,12-0,5 [8], 4	0,5-1,0 [8], 32	0,13-0,25 [8], >32
0,06-0,25 [7], 4	0,5 [7], 2	0,06 [7], 2
0,5 [2]	1,2 [2]	0,13-0,25 [2]
4->128 [9]	NE***	NE

ero de aislados ensayados

o de aislados con este valor o valores de la CMI; cuando no hay  
in aislado tiene este valor de la CMI.

Los antibióticos A-21978C también inhiben el crecimiento de ciertas bacterias anaerobias. La Tabla XIV contiene datos de la actividad de la mezcla A-21978C y de los factores C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> de A-21978C contra diversas bacterias anaerobias, utilizando el ensayo de dilución en agar habitual.

TABLA XIV

Organismo de ensayo	CMI (mcg/ml)					Mezcla	
	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>		C <sub>5</sub>
<u>Actinomyces israelii</u>	2	4	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
<u>Clostridium perfringens</u>	2	16	8	8	1,0	0,5	8
<u>Clostridium septicum</u>	4	4	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
<u>Eubacterium aerofaciens</u>	4	16	8	4	2	0,5	8
<u>Peptococcus asaccharolyticus</u>	4	4	2	1,0	1,0	0,5	1,0
<u>Peptococcus prevoti</u>	4	2	1,0	<0,5	2	0,5	<0,5
<u>Peptostreptococcus anaerobius</u>	0,25	2	1,0	1,0	0,25	0,25	1,0
<u>Peptostreptococcus intermedius</u>	2	4	1,0	<0,5	1,0	0,25	1,0
<u>Propionibacterium acnes</u>	1	8	2	1,0	0,5	0,25	2
<u>Bacteroides fragilis</u>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<u>Fusobacterium symbiosum</u>	4	>128	>128	16	4	2	>128
<u>Fusobacterium necrophorum</u>	2	64	64	32	4	0,5	>128

1 Los antibióticos A-21978C también inhiben el crecimiento de ciertas  
 contiene datos de la actividad de la mezcla A-21978C y de los factores (   
 bacterias anaerobias, utilizando el ensayo de dilución en agar habitual.

TABLA XIV

Organismo de ensayo	CMI (mc)			
	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
<u>Actinomyces israelii</u>	2	4	1,0	0,25
<u>Clostridium perfringens</u>	2	16	8	4
10 <u>Clostridium septicum</u>	4	4	1,0	0,25
<u>Eubacterium aerofaciens</u>	4	16	8	4
<u>Peptococcus asaccharolyticus</u>	4	4	2	1
<u>Peptococcus prevoti</u>	4	2	1,0	<0,25
<u>Peptostreptococcus anaerobius</u>	0,25	2	1,0	1
15 <u>Peptostreptococcus intermedius</u>	2	4	1,0	<0,25
<u>Propionibacterium acnes</u>	1	8	2	1
<u>Bacteroides fragilis</u>	>128	>128	>128	>128
<u>Fusobacterium symbiosum</u>	4	>128	>128	16
<u>Fusobacterium necrophorum</u>	2	64	64	32

20

25

30

en el crecimiento de ciertas bacterias anaerobias. La Tabla XIV de A-21978C y de los factores C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> de A-21978C contra diversas diluciones en agar habitual.

TABLA XIV

CMI (mcg/ml)						
C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	Mezcla
2	4	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
2	16	8	8	1,0	0,5	8
4	4	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
4	16	8	4	2	0,5	8
4	4	2	1,0	1,0	0,5	1,0
4	2	1,0	<0,5	2	0,5	<0,5
0,25	2	1,0	1,0	0,25	0,25	1,0
2	4	1,0	<0,5	1,0	0,25	1,0
1	8	2	1,0	0,5	0,25	2
>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
4	>128	>128	16	4	2	>128
2	64	64	32	4	0,5	>128

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

Los factores A-21978C han presentado actividad antimicrobiana in vivo contra infecciones bacterianas experimentales. Cuando se administraron dos dosis del compuesto ensayado a ratones en infecciones ilustrativas, la actividad observada se midió como  $DE_{50}$  [dosis en mg/kg efectiva para proteger al 50 % de los animales experimentales: véase Warren Wick y colaboradores, J. Bacteriol. 81, 233-235 (1961)]. Los valores  $DE_{50}$  observados para la mezcla A-21978C y los factores  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_0$ ,  $C_4$  y  $C_5$  de A-21978C se encuentran en la Tabla XV.

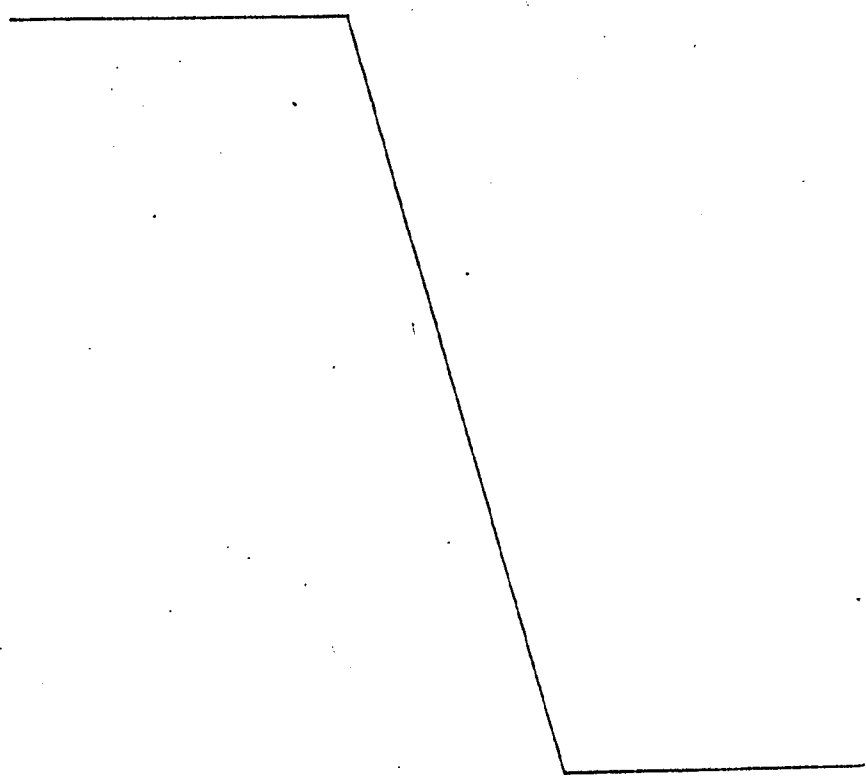


TABLA XV

Actividad comparativa in vitro e in vivo

Antibiótico	<u>Staphylococcus aureus</u>		<u>Streptococcus pyogenes</u>		<u>Streptococcus pneumoniae</u>		
	CMI <sup>1</sup>	DE <sub>50</sub> <sup>2</sup>	CMI	DE <sub>50</sub> <sup>2</sup>	CMI	DE <sub>50</sub> <sup>2</sup>	
A-21978C <sub>1</sub>	0,5	0,22	0,13	0,064	93	0,12	0,3
A-21978C <sub>2</sub>	0,13	0,16	0,13	0,032	59	0,13	0,14
A-21978C <sub>3</sub>	0,06	0,08	0,06	0,032	66	0,03	0,09
A-21978C <sub>0</sub>			0,25	0,15		0,5	0,88
A-21978C <sub>4</sub>			0,13	0,10		0,5	0,36
A-21978C <sub>5</sub>			0,06	0,053		0,06	0,17
Mezcla A-21978C	0,13	0,18	<0,03	0,043		0,13	0,1
Eritromicina	0,13	0,5	0,13	0,64		0,5	7,3

<sup>1</sup> CMI = concentración mínima de inhibición (µg/ml), dilución con agar

<sup>2</sup> Administración subcutánea

<sup>3</sup> Administración oral.



TABLA XV

arativa in vitro e in vivo

<u>Streptococcus pyogenes</u>			<u>Streptococcus pneumoniae</u>	
<u>I</u>	<u>DE<sub>50</sub><sup>2</sup></u>	<u>DE<sub>50</sub><sup>3</sup></u>	<u>CMI</u>	<u>DE<sub>50</sub><sup>2</sup></u>
,13	0,064	93	0,12	0,3
,13	0,032	59	0,13	0,14
,06	0,032	66	0,03	0,09
,25	0,13		0,5	0,88
,13	0,10		0,5	0,36
,06	0,053		0,06	0,17
,03	0,043		0,13	0,1
,13	0,64		0,5	7,3

( $\mu\text{g/ml}$ ), dilución con agar

1           En un aspecto importante de esta invención, los factores A-21978C y la mezcla A-21978C son eficaces para el tratamiento de la pielonefritis. Por ejemplo, en una infección experimental de pielonefritis descendente en ratas,  
5           los factores A-21978C proporcionaban una protección superior a la de la vancomicina. En este ensayo, el cultivo bacteriano utilizado era Streptococcus faecalis (Guze). El cultivo se desarrolló sobre agar de soja-tripticosa (BBL), suspendido en caldo de infusión de corazón y cerebro (BBL),  
10           dividido en porciones de 0,2 ml y congelado en nitrógeno líquido. Las suspensiones bacterianas para la inoculación de ratas se prepararon diariamente sembrando un matraz de 50 ml de caldo de soja-tripticosa (BBL) con una ampolla congelada y desarrollando el cultivo durante la noche a  
15           37°C en un aparato sacudidor. El cultivo de S. faecalis se diluyó hasta  $5 \times 10^8$  unidades formadores de colonia por mililitro. Los compuestos a ensayar se inyectaron subcutáneamente una vez al día durante 7 días. Todos los compuestos estaban suspendidos en carboximetilcelulosa al  
20           0,125 %.

          Las infecciones experimentales en ratas se produjeron por el siguiente procedimiento. Unas hembras de ratas albino seleccionadas al azar (Cox-Wistar), con un peso de 190 a 210 g, se anestesiaron por inyección intraperitoneal de  
25           12 mg de metohexital sódico suplementado como fuera necesario. El modelo de pielonefritis experimental estaba basado en los estudios de Guze y Beeson, donde el ureter izquierdo se ocluye durante 20 minutos y después se administra una inyección de 0,5 ml del organismo experimental en la vena  
30           femoral. La terapia antimicrobiana se inició cuatro o cinco

1 horas después de la infección. Cuatro horas después del  
último tratamiento, se sacrificaron las ratas, se extirpó  
su riñón izquierdo y se homogeneizó en una picadora Duall  
que contenía 9 ml de suero fisiológico salino. Esto repre-  
5 senta una dilución  $10^{-1}$  del tejido de riñón. Las diluciones  
a diez veces adicionales en suero salino se basaron en las  
células bacterianas previstas en el tejido homogeneizado.  
Finalmente, se prepararon por duplicado unas placas de ver-  
tido de agar a partir de varias de estas diluciones y las  
10 placas se incubaron durante la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los resultados  
terapéuticos se expresaron en dos formas: (i) el porcentaje  
de ratas con un número de cuentas en el riñón inferior a  
 $10^2$  por gramo de tejido renal, denominadas "curaciones" y  
(ii) el porcentaje de ratas con una reducción de como míni-  
15 mo  $4\text{-log}_{10}$  en el título bacteriano en comparación con los  
riñones de control infectados. Las ratas de control se tra-  
taron solamente con carboximetilcelulosa al 0,125 %. El nú-  
mero de cuentas de células viables en el tejido renal en  
las ratas de control con S. faecalis osciló entre  $1,2 \times 10^8$   
20 y  $4,6 \times 10^8$  por gramo de tejido homogeneizado.

Los resultados de estos estudios se encuentran en la  
Tabla XVI.

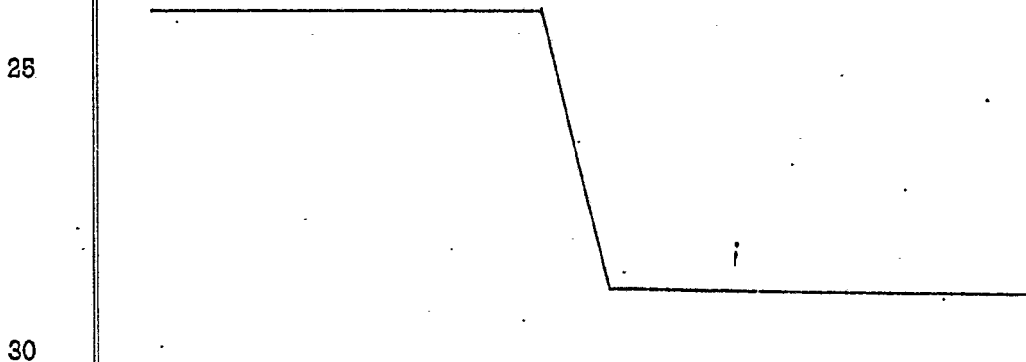


TABLA XVI

Ensayo de la pielonefritis descendente en ratas, causada por *Streptococcus faecalis*

Antibiótico ensayado	CMV <sup>1</sup> (µg/ml)	Dosis a ratas <sup>2</sup> , mg/kg x 7	Porcentaje de ratas con una disminución del título de 4-log	Porcentaje de ratas curadas
Vancomicina	1,0	12,0	55	33
A-21978C <sub>1</sub>	1,0	1,0	50	50
A-21978C <sub>2</sub>	0,25	1,0	100	89
A-21978C <sub>3</sub>	0,13	1,0	78	78
Complejo A-21978C	0,25	1,0	89	89

1 Susceptibilidad in vitro de la variedad *S. faecalis* Guze.

2 Administración subcutánea.

1

TABLA XVI

Ensayo de la pielonefritis descendente en ratas, causada por S:

Antibiótico ensayado	CMI <sup>1</sup> (µg/ml)	Dosis a ratas <sup>2</sup> , mg/kg x 7	Porcentaje disminución c	
5	Vancomicina	1,0	12,0	
	A-21978C <sub>1</sub>	1,0	1,0	
	A-21978C <sub>2</sub>	0,25	1,0	1
	A-21978C <sub>3</sub>	0,13	1,0	
10	Complejo A-21978C	0,25	1,0	

1 Susceptibilidad in vitro de la variedad S. faecalis Guze.

2 Administración subcutánea.

15

20

25

30

TABLA XVI

de en ratas, causada por Streptococcus faecalis

<u>de en ratas<sup>2</sup>, g x 7</u>	<u>Porcentaje de ratas con una disminución del título de 4-log.</u>	<u>Porcentaje de ratas curadas</u>
12,0	55	33
1,0	50	50
1,0	100	89
1,0	78	78
1,0	89	89

faecalis Guze.

1 Los valores de la toxicidad para los factores A-21978C principales y para la mezcla A-21978C se encuentran en la Tabla XVII.

5 TABLA XVII  
Toxicidad del A-21978C

A-21978C	DE <sub>50</sub> (mg/kg)		
	Ratón		Rata
	IV	SC	IV
Factor C <sub>1</sub>	>250	>365	479 ± 32
10 Factor C <sub>2</sub>	150-250	175	204 ± 17
Factor C <sub>3</sub>	<50	70-75	<160
Mezcla	150	175-190	169 ± 10

15 Cuando se utiliza como agente antibacteriano la mezcla A-21978C o un factor A-21978C, puede ser administrado por vía oral o parenteral. Como observarán los expertos en este campo, la mezcla o factor A-21978C se administra normalmente junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La dosis de mezcla o factor A-21978C depende de diversas consideraciones como, por ejemplo, la naturaleza y gravedad de la infección particular en tratamiento. Los expertos en este campo observarán que las dosis apropiadas y/o las dosis unitarias para la administración pueden ser determinadas teniendo en cuenta los valores de la CMI y de la DE<sub>50</sub> y los datos sobre la toxicidad dados aquí, junto con factores 20 tales como el paciente o huésped y el microorganismo infeccioso.

25 Los antibióticos A-21978 también son útiles como agentes promotores del crecimiento en animales. En los pollos, por ejemplo, la mezcla A-21978C mejora el aumento de peso y el 30 rendimiento del pienso. La Tabla XVIII resume los resultados

1 de dos ensayos que ponen de manifiesto esta actividad. En  
estos ensayos, la mezcla A-21978C fué administrada a los ani-  
males a una concentración de 25 g por ton (1 ton = 908 kg)  
de pienso. El antibiótico se administró a cuatro duplicados  
5 de 8 aves cada uno en un estudio temporal duplicado realiza-  
do en baterías (total de 8 duplicados de 8 aves o 64 aves).  
El periodo experimental fué un periodo de 21 días a partir  
de 7-28 días de edad de los pollos. Los valores del comporta-  
miento del desarrollo (aumento de peso, consumo de pienso y  
10 rendimiento del pienso) se compararon con los de 40 duplicados  
de un tratamiento de control simultáneo.

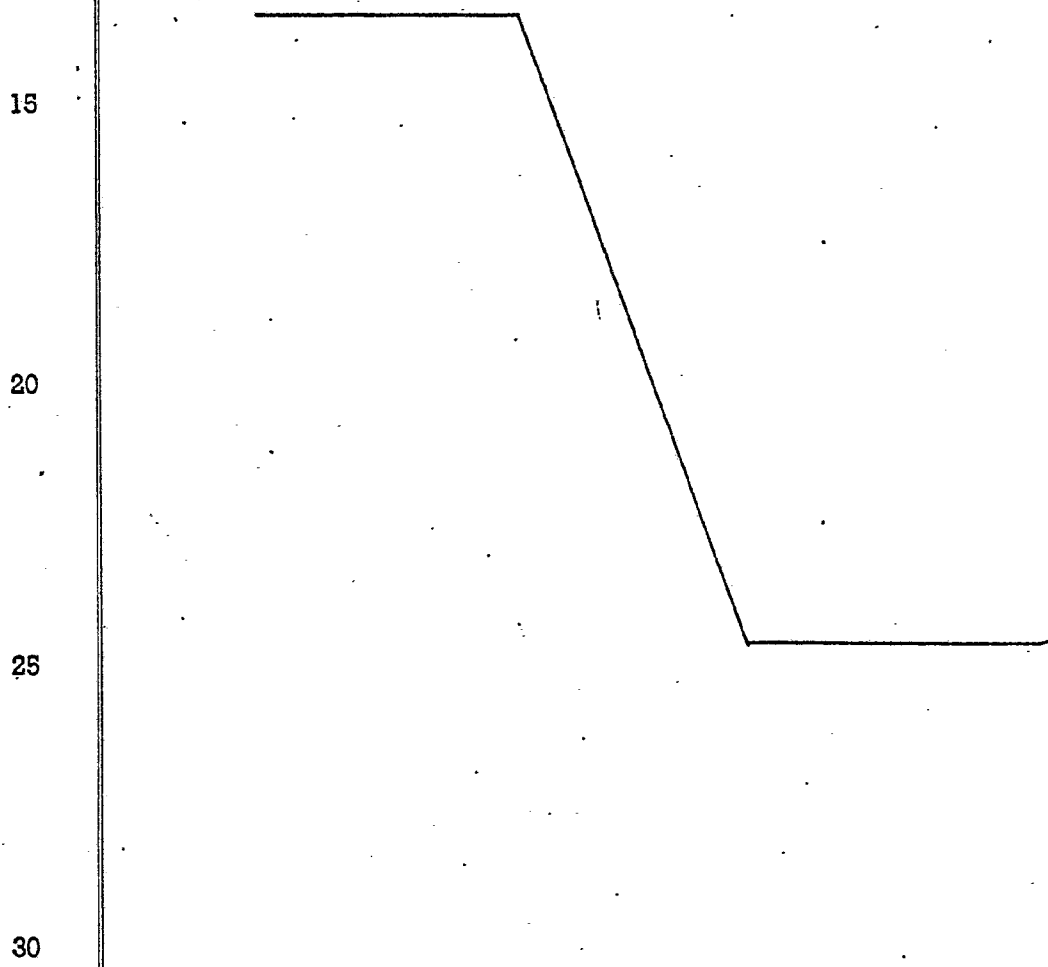


TABLA XVIII

Exp.	Tratamiento	Concentración (g/ton)	Aumento de peso (g)	% de mejora	Concentración en el pienso(g)	Pienso/aumento	% de mejora
1	Control	-	414	-	734	1,773	-
	A-21978C	25	431	4,10	750	1,741	1,80
2	Control	-	423	-	704	1,665	-
	A-21978C	25	432	2,12	683	1,582	4,99

<sup>1</sup>  $\frac{\text{Media de tratamiento} - \text{Media de control}}{\text{Media de control}} \times 100 = \% \text{ de mejora.}$



TABLA XVIII

<u>acción</u>	<u>Aumento de peso (g)</u>	<u>% de mejora<sup>1</sup></u>	<u>Concentración en el pienso(g)</u>	<u>Pienso/aumento</u>	<u>% de mejora</u>
414	-	-	734	1,773	-
431	4,10	4,10	750	1,741	1,80
423	-	-	704	1,665	-
432	2,12	2,12	683	1,582	4,99

1 Los antibióticos A-21978 son típicamente eficaces para  
promover el crecimiento del ganado aviar cuando se adminis-  
tran con el pienso de los animales en proporciones de apro-  
ximadamente 1 a 100 g del antibiótico A-21978 por ton (908  
5 kg) de pienso animal.

Para ilustrar con más detalle la puesta en práctica de  
esta invención, se dan los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

A. Fermentación en matraz sacudido de A-21978C

10 Una pastilla liofilizada de Streptomyces roseosporus  
NRRL 11379 se disuelve en 1-2 ml de agua esterilizada. Esta  
solución se utiliza para inocular un tubo inclinado de agar  
de la siguiente composición:

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidades (%)</u>
15 Glucosa	0,5
Extracto de levadura	0,2
CaCO <sub>3</sub>	0,3
Agar	2,0
Jugo de verduras*	20,0
20 Agua desionizada	

pH no ajustado 6,1; pH después de tratar en autoclave 5,9

\* Jugo V/8 Campbell Soup Co.

25 El tubo inculado se incuba a 30°C durante unos 7 a  
10 días. El cultivo inclinado maduro se cubre con 10 ml de  
agua destilada estéril y se rasca con una pipeta estéril pa-  
ra soltar las esporas. Se utilizan porciones de 1 ml de la  
suspensión de esporas resultante para inocular 50 ml de un  
medio vegetativo de la siguiente composición:

1	<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidades (%)</u>
	Caldo de soja tripticasa*	3,0
	Dextrina	2,5
	Agua desionizada	

5 \* Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, Md.

El medio vegetativo inoculado se incubó en un Erlenmeyer de 250 ml a 30°C durante unas 48 horas, en un sacudidor que gira describiendo un arco de 2" (5 cm) de diámetro a 250 rpm.

10 Este medio vegetativo incubado (0,5 ml) se utiliza para inocular 50 ml de un medio de producción con la siguiente composición:

	<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidades (g/l)</u>
	Glucosa	7,5
15	Dextrina de tapioca*	30,0
	Hidrolizado enzimático de caseína**	5,0
	Caseína hidrolizada enzimáticamente***	5,0
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17,4
	L-Asparagina anhidra	1,32
20	Agua desionizada, c.s.	hasta 1 litro.

\* Stadex 11, A.E. Staley, Co., Decatur, Ill.

\*\* NZ Amine A, Sheffield Chemical Co., Norwich, N.Y.

\*\*\* Amber EHC, Amber Laboratories, Juneau, Wisc.

25 El medio de producción inoculado se incubó en un Erlenmeyer de 250 ml a 30°C durante 6-7 días en un sacudidor que giraba describiendo un arco de 2" (5 cm) de diámetro, a 250 rpm.

B. Fermentación en tanque del A-21978C

30 Para conseguir un mayor volumen de inóculo, se utilizaron 10 ml de medio vegetativo incubado, preparado como se

1 ha descrito antes, para inocular 400 ml de un medio de creci-  
miento vegetativo de segunda fase, con la misma composición  
que el medio vegetativo. Este medio de segunda fase fué incu-  
bado en un matraz de 2 litros durante 48 horas a 30°C, sobre  
5 un sacudidor que giraba describiendo un arco de 2" (5 cm) de  
diámetro, a 250 rpm.

El medio vegetativo de segunda fase incubado (800 ml)  
así preparado se utilizó para inocular 100 litros de un medio  
de producción estéril con la composición dada en la Sección A.  
10 El medio de producción inoculado se dejó fermentar en un tan-  
que de fermentación de 165 litros durante unos 6-8 días a una  
temperatura de 30°C. El medio de fermentación se aireó con  
aire estéril a una presión de 1 atmósfera, para mantener una  
saturación de aire superior al 30 %, agitando con los agita-  
dores convencionales a 200-300 rpm.  
15

#### EJEMPLO 2

##### Separación de la mezcla antibiótica A-21978C

Empleando un filtro prensa, se filtraron 1600 galones  
( 6048 litros) de caldo de fermentación completo, obtenido  
20 como se ha descrito en el Ejemplo 1, empleando un 3 % de auxi-  
liar de filtración (Celite 545, Johns-Manville Products Corp.).  
La torta del filtro se lavó con agua para dar un filtrado to-  
tal de 4100 litros que contenía 230 unidades/ml. El pH del  
filtrado se ajustó a 3,5 con HCl y el filtrado acidulado se  
25 mantuvo a la temperatura ambiente durante 16 horas para permi-  
tir que precipitaran los factores activos. Se agregó a la sus-  
pensión el auxiliar de filtración (0,75 % de Celite 545) y  
el precipitado se separó por filtración. La torta del filtro  
se extrajo dos veces con 410 litros de metanol, agitando cada  
30 vez durante una hora antes de filtrar. A los extractos metanó-

1 licos combinados (720 litros) se agregaron 0,1 volúmenes de  
agua (72 litros). El pH de esta solución se ajustó a 6,5-7,0  
con NaOH. La solución se concentró a vacío hasta aproximada-  
5 mente un veínteavo de su volumen (30 litros) para separar el  
metanol; durante la concentración se agregó agua destilada a  
medida que era necesario. Se agregaron con agitación 3/4 vo-  
lúmenes de n-butanol (22 litros). El pH de la solución resul-  
tante se ajustó a 3,0 con HCl. Se separaron las fases y la  
10 fase n-butanólica, que contenía la actividad, se concentró a  
vacío hasta dar un residuo. Este residuo se disolvió en una  
cantidad mínima de metanol; la solución metanólica se agregó  
a 30 volúmenes de acetona para precipitar la mayor parte de  
la mezcla de A-21978C. El precipitado se separó por filtración  
y se secó para dar 247 g de la mezcla A-21978C cruda (780 uni-  
15 dades/mg).

El filtrado de metanol-acetona que contenía la porción  
residual de la mezcla A-21978 (factores A y B) se concentró  
a un residuo. El residuo se disolvió en ter-butanol/agua  
20 (5:1) y esta solución se liofilizó para dar 169 g de la mez-  
cla A-21978.

### EJEMPLO 3

#### A. Purificación de la mezcla A-21978C

25 Se suspenden 734 g de la mezcla A-21978C cruda, prepara-  
da como se ha descrito en el Ejemplo 2, en 25 litros de agua  
y el pH de esta suspensión se ajusta a 6,5 con NaOH 5N para  
disolver completamente el material. Esta solución se aplica  
a una columna que contiene 27 litros de resina cambiadora de  
ion (ciclo de acetato) (IRA68, Rohm & Haas Co.). La columna  
se lava con 4 volúmenes de columna de agua (108 litros) y  
30 después con 5 volúmenes de columna de ácido acético 0,1N (135

1        litros). La sustancia activa se eluye con ácido acético 0,5N  
recogiendo fracciones de unos 120 litros y analizando en ca-  
da fracción la actividad biológica.

5        Las fracciones muy activas se combinan y liofilizan para  
dar 278 g de la mezcla A-21978C de color marrón (1100 unida-  
des/mg); se combinan las fracciones de baja actividad para  
dar 238 g de mezcla A-21978C marrón (880 unidades/mg).

B. Purificación adicional de la mezcla A-21978C

10       Se suspenden 150 g de la preparación más activa de mez-  
cla A-21978C, procedente de la columna de IRA-68, en 600 ml  
de agua y el pH se ajusta a 6,5 para disolver completamente  
la preparación suspendida; se agrega una cantidad suficiente  
de gel de sílice seco (Grace, grado 62) para absorber la so-  
lución acuosa. Esta preparación de gel de sílice húmedo se  
15       introduce en una columna de gel de sílice de 30 litros (Gra-  
ce 62), de 10 x 375 cm, preparada con acetonitrilo (el gel  
de sílice ha sido previamente lavado con agua para separar  
las partículas finas; después la columna se rellena con el  
gel de sílice suspendido en agua y la columna de gel de sí-  
lice se lava con 30 litros de acetonitrilo). Después de car-  
20       gada, la columna se lava con 15 litros de acetonitrilo y des-  
pués se desarrolla con acetonitrilo/agua (4:1), recogiendo  
fracciones de unos 4 litros. La elución se sigue por bioaná-  
lisis y bioautograma por cromatografía en capa fina de gel  
de sílice [CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (3:1)]. Se combinan las fracciones que  
25       contienen solamente la mezcla A-21978C (fracciones 43-60),  
se concentran a vacío y se liofilizan para dar 86,2 g del  
complejo purificado A-21978C de color beige amarillento  
(1160 unidades/mg). Las fracciones 21-29, que contienen los  
30       factores D y C se combinan y liofilizan para dar 13 g de un

1 polvo amarillo con baja actividad biológica.

5 La mezcla A-21978C purificada (30 g) así obtenida se decolora de nuevo suspendiendo 30 g de esta mezcla en una cantidad mínima de agua y mezclando con una pequeña cantidad de  
10 gel de sílice (Tipo LP-1, 10-20 micras, Quantum Industries, 341 Kaplan Drive, Fairfield, N.J. 07006) para absorber la solución. La mezcla de gel de sílice húmedo se suspende en acetonitrilo/metanol (4:1) y se introduce en una columna de perlas de vidrio de 4 x 30 cm (D.E.) conectada a una columna  
15 de vidrio de 6,5 x 82 cm (D.E.) que contiene 2,8 litros de gel de sílice (Quantum LP-1), preparada en acetonitrilo/metanol (4:1). [El gel de sílice se lava previamente con agua y después con acetonitrilo/metanol (4:1) y la columna se rellena con el gel de sílice en acetonitrilo/metanol (4:1) bajo una presión de 50-60 psi (3,5-4,2 kg/cm<sup>2</sup>)]. La columna cargada y la columna principal se lavan con 3 litros de acetonitrilo/metanol (4:1) a 50 psi (3,5 kg/cm<sup>2</sup>). La sustancia activa se eluye con acetonitrilo/metanol/agua (55:20:25),  
20 recogiendo fracciones de 300 ml. La elución se sigue por bioanálisis (Micrococcus luteus). Las fracciones 14-25 presentan la máxima actividad y se combinan, concentran y liofilizan para dar 24 g de mezcla A-21978C pura, de color amarillo pálido, en forma de sal sódica (1250 unidades/mg). Las fracciones 26-32 son menos activas; se combinan, concentran y  
25 liofilizan para dar 1,6 g de mezcla A-21978C menos pura (780 unidades/mg).

#### EJEMPLO 4

##### Separación de los factores A-21978C

30 En 40 ml de agua se disuelven 2 g de la mezcla A-21978C purificada, obtenida como se ha descrito en el Ejemplo 3, y

se aplica a través de una bomba (Bomba FMI LAB, Fluid Metering, Inc. 48 Summit St., Oyster Bay, N.Y. 11771) a 50 psi (3,5 kg/cm<sup>2</sup>), sobre una columna de 4,1 x 60 cm de gel de sílice en fase inversa (gel de sílice/C<sub>18</sub> Quantum LP-1) preparada en agua/metanol/acetonitrilo (100:15:85) conteniendo 0,15 % de ácido acético y 0,15 % de piridina. La columna se desarrolla a 65 psi (4,5 kg/cm<sup>2</sup>) con este disolvente, recogiendo fracciones de 25 ml. La elución de los factores se sigue por UV a 280 nm y por bioanálisis. Se analiza la pureza del factor de las fracciones individuales sobre una columna analítica. Las separaciones típicas fueron las siguientes: Las fracciones 33-37 contenían el factor C<sub>0</sub>; las fracciones 45-53 contenían el factor C<sub>1</sub>; las fracciones 75-92 contenían el factor C<sub>2</sub>; las fracciones 112-134 contenían el factor C<sub>3</sub>; las fracciones 54-74 contenían los factores C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>4</sub> y las fracciones 93-111 contenían los factores C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub>. Las fracciones que contenían una mezcla de factores se volvieron a aplicar a la columna para obtener nuevos rendimientos de C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>, así como los factores C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub>. Las fracciones que contenían un solo factor se combinaron, se concentraron a vacío y se liofilizaron para dar polvos de color amarillo pálido de cada uno de los factores (en forma de sales sódicas). A partir de 60 g de mezcla inicial, los rendimientos fueron los siguientes: factor C<sub>1</sub> = 5,55 g; factor C<sub>2</sub> = 10 g; factor C<sub>3</sub> = 6,61 g. Las fracciones que contenían una mezcla de factores se reciclaron sobre la columna de resina de fase inversa para dar rendimientos adicionales: factor C<sub>0</sub> = 550 mg; factor C<sub>1</sub> = 1,29 g; factor C<sub>2</sub> = 1,99 g; factor C<sub>3</sub> = 443 mg; factor C<sub>4</sub> = 512 mg y factor C<sub>5</sub> = 384 mg.

1

EJEMPLO 5

Separación y purificación a gran escala de los factores

A-21978C

5

A mayor escala, los factores se separaron por cromatografía en columna de fase inversa. La mezcla A-21978C pura (6 g), obtenida como se ha descrito en el Ejemplo 3, se disolvió en 80 ml de agua. El pH de esta solución se ajustó a 4,4 con ácido acético y se agregaron 20 ml de tetrahidrofurano. La solución se bombeó a baja presión (Bomba Lapp) sobre una columna de acero (4,8 x 100 cm) que contenía 1,77 litros de gel de sílice/C<sub>18</sub> [Quantum LP-1, 10-20 micras, sili-

10

lada con octadeciltriclorosilano], preparada en agua/tetra-

15

hidrofurano (THF) (4:1). La columna se lavó a presión, (alrededor de 100 psi, 7 kg/cm<sup>2</sup>) con 150 ml de H<sub>2</sub>O/THF (4:1). La columna se desarrolló con agua/metanol/acetoneitrilo (47,5:15

20

37,5) conteniendo 0,2 % de piridina y 0,2 % de ácido acético a unas 100 psi (7 kg/cm<sup>2</sup>) y a un caudal de 35 ml/minuto, recogién- dose fracciones de 175 ml. La elución se siguió continuamente sobre un registro con un detector ultravioleta (UV) a 280 nm. Las fracciones que contenían los factores individuales, indicado por los picos sobre el gráfico, se comprobaron de nuevo en una columna de resina analítica de fase inversa. Las fracciones que contenían un solo factor se combinaron y liofilizaron. Una operación típica es la ilustrada a conti-

25

nuación: las fracciones 12-16 contenían el factor C<sub>0</sub>; las fracciones 20-26 contenían el factor C<sub>1</sub>; las fracciones 38-50 contenían el factor C<sub>2</sub>; las fracciones 63-78 contenían el factor C<sub>3</sub>. Las fracciones 27-37 (que contenían los factores C<sub>1</sub> y C<sub>4</sub>) y las fracciones 51-62 (que contenían los factores C<sub>2</sub> y C<sub>5</sub>) fueron recicladas a través de la columna para obte-

30

1 ner los factores C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> puros. Las cargas de la columna osci-  
laban entre 6 y 12 g. Los rendimientos de un total de 84 g  
de mezcla A-21978C fueron los siguientes: 1,9 g de C<sub>0</sub>, 3,27 g  
de C<sub>1</sub>, 4,97 g de C<sub>2</sub> y 1,94 g de C<sub>3</sub>. Se obtuvieron mayores  
5 rendimientos de los factores individuales reciclando las frag-  
ciones que contenían mezclas de factores, utilizando los sis-  
temas disolventes HPLC apropiados. El sistema elegido varia-  
ba y dependía de los lotes individuales y de la resina y co-  
lumnas de fase inversas.

10 Los siguientes son sistemas útiles para la separación  
de los factores A-21978C:

A. Sistemas analíticos

Agua/metanol/acetonitrilo (50:15:35) conteniendo 0,2 % de  
ácido acético (HOAc) ajustado a pH 5,5 con piridina.

15 Agua/metanol/acetonitrilo (50:15:35) conteniendo 0,2 % de  
HOAc y 0,2 % de piridina

Agua/metanol/acetonitrilo (50:15:35) conteniendo 0,75 %  
de formiato amónico

20 Agua/metanol/acetonitrilo (95:30:75) conteniendo 0,2 % de  
HOAc y 0,2 % de piridina

Agua/metanol/acetonitrilo (105:15:80) conteniendo 0,2 % de  
HOAc y 0,2 % de piridina

Agua/metanol/THF (59:15:25) conteniendo 0,5 % de HOAc y 0,5 %  
de piridina

25 Agua/metanol/THF (60:15:25) conteniendo 0,5 % de formiato  
amónico.

B. Sistemas preparativos

Agua/metanol/acetonitrilo (95:20:85) conteniendo 0,15 % de  
HOAc y 0,15 % de piridina

30 Agua/metanol/acetonitrilo (100:15:85) conteniendo 0,15 % de

- 1 HOAc y 0,15 % de piridina  
Agua/metanol/acetonitrilo (50:10:40) conteniendo 0,1 % de  
HOAc y 0,1 % de piridina  
5 Agua/metanol/acetonitrilo (50:15:35) conteniendo 0,75 % de  
formiato amónico  
Agua/metanol/acetonitrilo (55:15:35) conteniendo 0,75 % de  
formiato amónico  
Agua/metanol/acetonitrilo (55:10:35) conteniendo 0,2 % de  
HOAc y 0,8 % de piridina  
10 Agua/metanol/THF (52,5:15:32,5) conteniendo 0,6 % de formiato  
amónico  
Agua/metanol/THF (50:15:35) conteniendo 0,6 % de formiato  
amónico.

15 La ventaja del ácido acético/piridina sobre el formiato  
amónico es que el primero puede ser separado durante la lio-  
filización mientras que el formiato amónico debe ser separa-  
do por cromatografía en columna (Sephadex G-25).

#### EJEMPLO 6

#### Método alternativo de aislamiento de la mezcla A-21978C

- 20 Se filtran 97 litros de un caldo de fermentación comple-  
to, obtenido como se ha descrito en el Ejemplo 1, con un  
auxiliar de filtración (4 % de Hyflo-Super-Cel); el filtra-  
do resultante (80 litros) se agita con 2 litros de copolímero  
25 macroporoso no iónico de estireno reticulado con divinilben-  
ceno (Resina Diaion HP-20, Mitsubishi Chemical Industries  
Limited, Tokyo, Japón), durante 2 horas. Se decanta el líqui-  
do que sobrenada, se lava la resina con 8 litros de agua y  
se decanta el agua. Después la resina se agita con 8 litros  
de acetonitrilo/agua (15:85) durante 15 minutos; el disol-  
30 vente se separa por filtración. Después la mezcla A-21978C

1 se eluye de la resina agitándola con 8 litros de acetonitrilo/agua (2:3) durante una hora y filtrando. Este proceso se repite para separar la totalidad de la mezcla A-21978C. Se combinan los dos filtrados y se concentran a vacío para dar un aceite. Este aceite se disuelve en un volumen mínimo de agua; se agregan calentando suavemente 2 volúmenes de metanol y después se añaden 30 volúmenes de acetona para precipitar la mezcla A-21978C. El precipitado se separa por filtración y se seca a vacío para dar 13,6 g de mezcla A-21978C cruda (570 unidades/mg).

5  
10  
15  
20  
25  
30  
La mezcla A-21978C cruda se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice. Se disuelve 1 g de la mezcla en un volumen mínimo de agua; se agrega gel de sílice (Grace 62) para absorber el agua y el absorbente se suspende en acetonitrilo. Esta suspensión se aplica a una columna de 1,5 x 40 cm de gel de sílice (Grace, grado 62) preparada en acetonitrilo. Después la columna se lava con acetonitrilo. La actividad se eluye con acetonitrilo/agua (4:1), recogiendo fracciones de 25 ml. Las fracciones se controlan como se ha descrito en el Ejemplo 3. Las fracciones 21 a 46, que contienen la mayor parte de la mezcla A-21978C, se combinan, se concentran a pequeño volumen a vacío y se liofilizan para dar 605 mg de mezcla A-21978C purificada (sal sódica) (900 unidades/mg).

#### EJEMPLO 7

##### Preparación de la mezcla A-21978C (forma ácida)

Se disuelven 7 g de la mezcla A-21978C en forma de sal sódica, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 6, en 150 ml de agua y se agregan 150 ml de n-butanol. El pH de la solución se ajusta a 3,4 con HCl 2N mientras se agita du-

1 rante una hora. Se separa la fase n-butanólica y se concen-  
tra a vacío hasta formar un residuo. Este residuo se disuel-  
ve en agua y se liofiliza para dar 6 g de mezcla A-21978C  
5 (forma ácida). Las sales de los factores A-21978C individua-  
les se convierten en las correspondientes formas ácidas por  
el mismo método.

EJEMPLO 8

Preparación de la sal sódica de la mezcla A-21978C a partir  
de la mezcla A-21978C en forma ácida

10 Se disuelven 50 mg de la mezcla A-21978C en forma ácida,  
preparada como se ha descrito en el Ejemplo 7, en 5 ml de  
etanol absoluto caliente; se agregan gota a gota NaOH 1N  
hasta que el pH de la solución es 9,4 y la solución resultan-  
te se mantiene a la temperatura ambiente durante la noche.  
15 El precipitado que se forma se separa por filtración y se se-  
ca a vacío para dar 32 mg de mezcla A-21978C (sal sódica).  
La sal contiene 8 % de sodio por el análisis de absorción  
atómica.

EJEMPLO 9

20 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 8, se  
forma la sal cálcica de la mezcla A-21978C por adición de  
CaCl<sub>2</sub> en etanol a una solución etanólica de mezcla A-21978C  
en forma ácida.

EJEMPLO 10

Análisis microbiológico de muestras de fermentación y aisla-  
miento de A-21978

25 El método utilizado para determinar cuantitativamente la  
actividad del A-21978 en los caldos de fermentación y en las  
muestras de aislamiento es un sistema de difusión en agar  
30 y disco de papel, utilizando Micrococcus luteus.

1 Unas placas de difusión de agar sembradas se preparan por inoculación de un medio de agar nutriente con una concentración apropiada del cultivo a ensayar, vertiendo 8 ml de agar en cada placa Petri de plástico de 20 x 100 mm.

5 El patrón de referencia del ensayo es una preparación de mezcla A-21978C. Esta preparación se utilizó sobre una base unitaria. La mezcla A-21978C muy purificada contiene alrededor de 1250 unidades por miligramo. La curva patrón de dosis-respuesta se prepara de manera que contenga 150-75-40-20-10 unidades/ml. El diluyente para el patrón y para las muestras es tampón de fosfato 0,1M, pH 6,0.

10 Las soluciones de muestra y patrón se dispensan sobre discos de papel de 12,7 mm con una pipeta automática. La incubación se realiza a 30°C durante 16-18 horas. Las zonas se leen en un lector de zona de antibióticos Fischer-Lilly modificado.

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

#### REIVINDICACIONES

20 1. Un método de producción de la mezcla antibiótica A-21978, caracterizado por cultivar Streptomyces roseosporus NRRL 11379 o un mutante del mismo productor de A-21978, en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones de fermentación aerobia sumergida, hasta que se ha producido una cantidad sustancial de actividad antibiótica.

25 2. Un método según la Reivindicación 1, caracterizado por la operación adicional de separar la mezcla A-21978, o una sal de la misma, del medio de cultivo.

30 3.. Un método según la Reivindicación 2, caracterizado

1 por la operación adicional de aislar la mezcla A-21978C, o una sal de la misma, de la mezcla A-21978 separada.

5 4. Un método según la Reivindicación 3, caracterizado por la operación adicional de aislar A-21978C factor  $C_0$ , o una sal del mismo, de la mezcla A-21978C separada.

5 5. Un método según la Reivindicación 3, caracterizado por la operación adicional de aislar A-21978C factor  $C_1$ , o una sal del mismo, de la mezcla A-21978C separada.

10 6. Un método según la Reivindicación 3, caracterizado por la operación adicional de aislar A-21978C factor  $C_2$ , o una sal del mismo, de la mezcla A-21978C separada.

15 7. Un método según la Reivindicación 3, caracterizado por la operación adicional de aislar A-21978C factor  $C_3$ , o una sal del mismo, de la mezcla A-21978C separada.

15 8. Un método según la Reivindicación 3, caracterizado por la operación adicional de aislar A-21978C factor  $C_4$ , o una sal del mismo, de la mezcla A-21978C separada.

20 9. Un método según la Reivindicación 3, caracterizado por la operación adicional de aislar A-21978C factor  $C_5$ , o una sal del mismo de la mezcla A-21978C separada.

20 10. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita por: UN METODO DE PRODUCCION DE LA MEZCLA ANTIBIOTICA A-21978.

25 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de cincuenta y cinco páginas mecanografiadas, y dibujos adjuntos.

Madrid, 16 Octubre 1.979

BERNARDO UNGRIA

I.P.



30

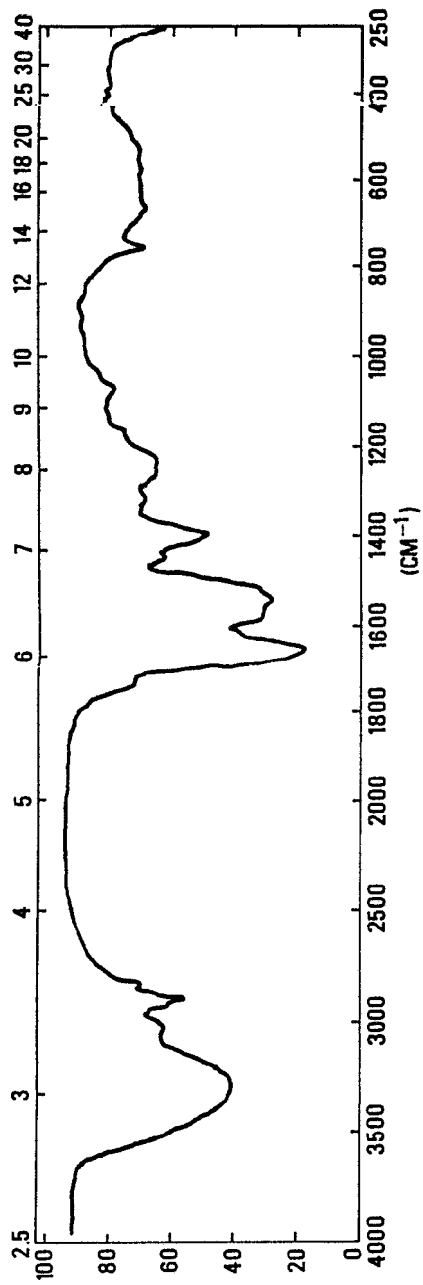


FIG. 1

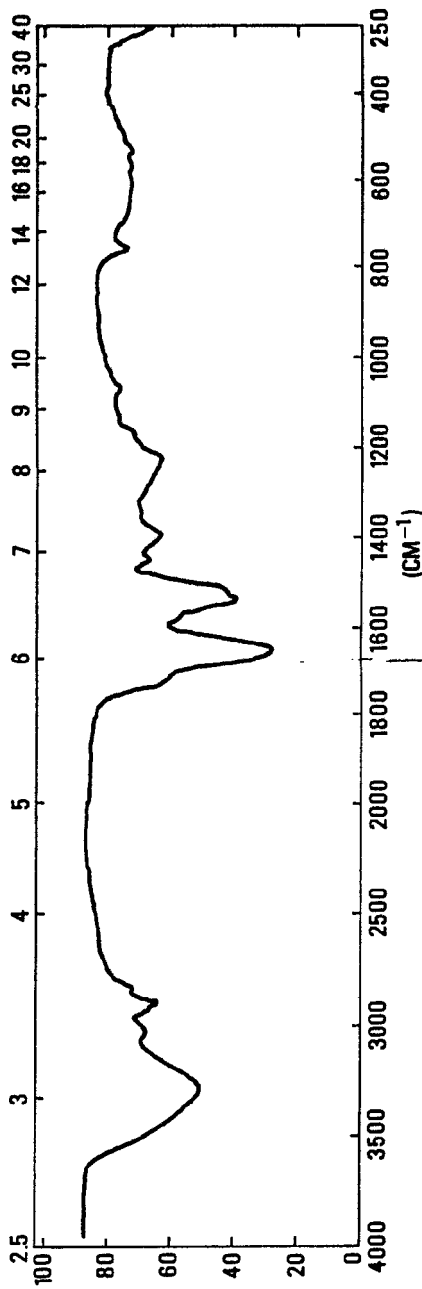


FIG. 2

ESCALA VARIABLE  
Madrid 16 de Octubre de 1.979  
FERNANDO UNGRÍA

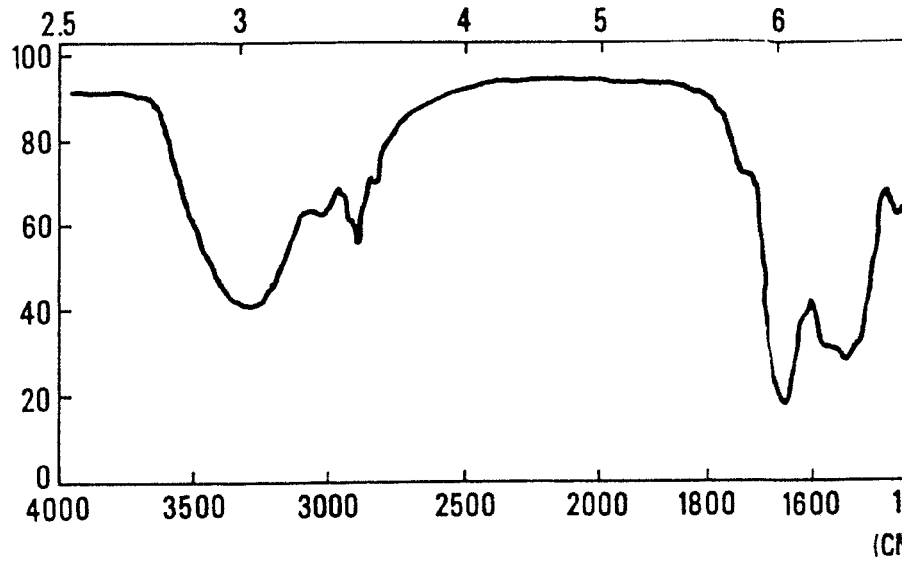


FIG. 1

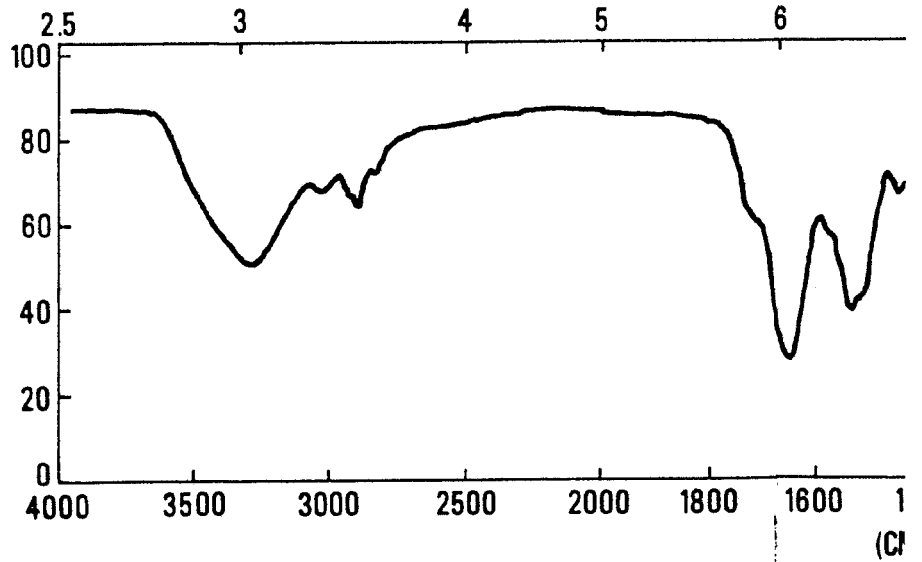
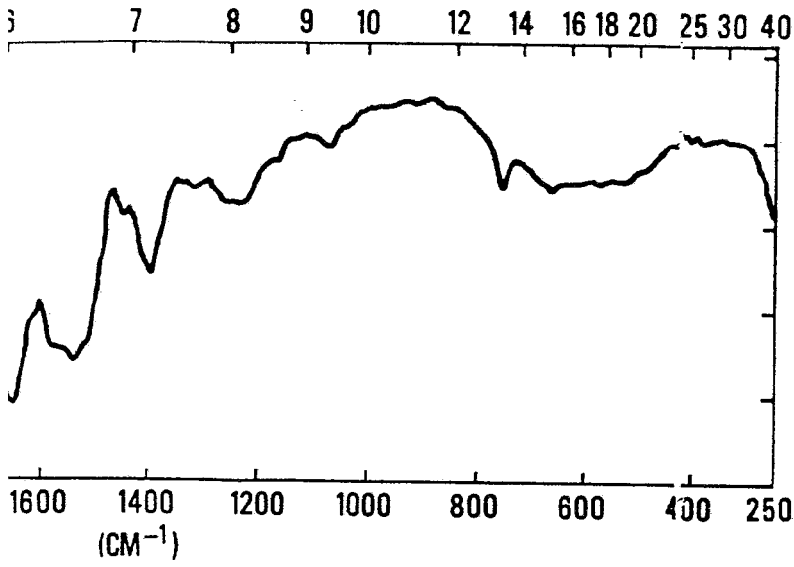
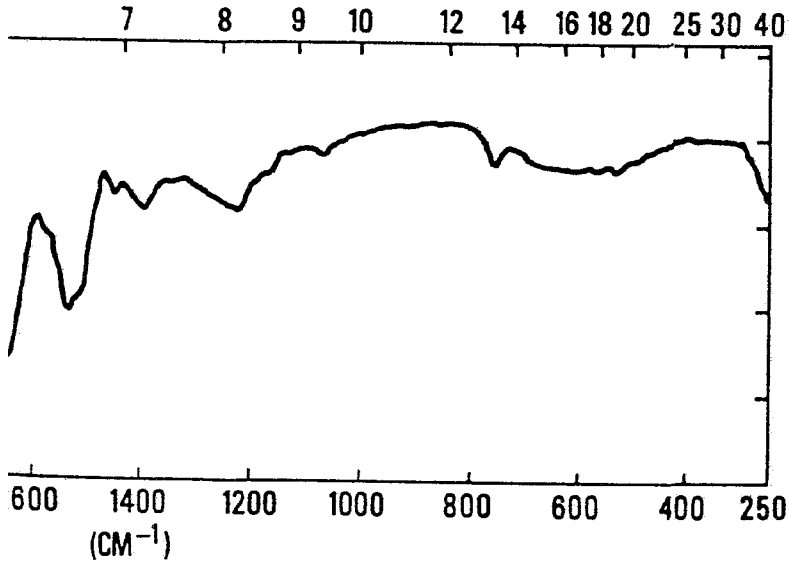


FIG. 2



G. 1



G. 2

ESCALA VARIABLE

Madrid 16 de Octubre de 1.979

BERNARDO UNGRIA

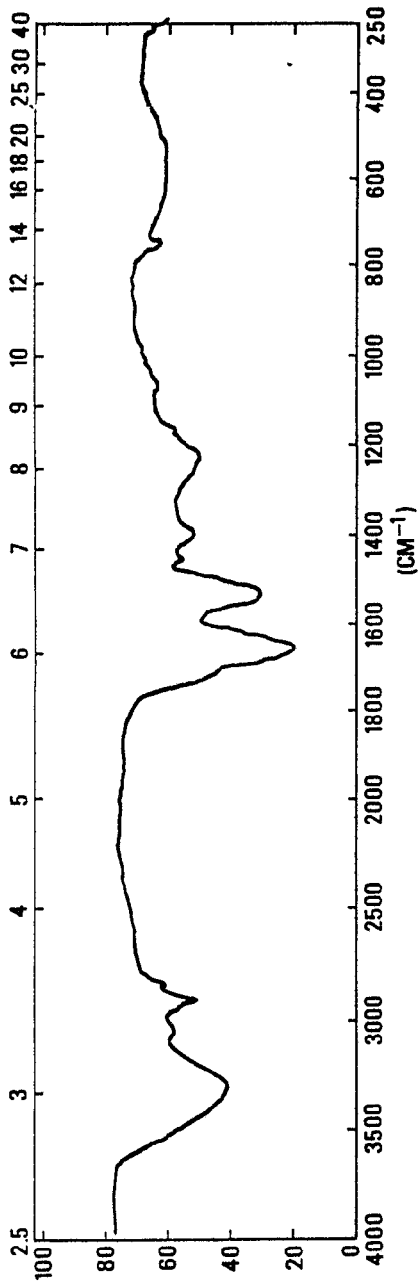


FIG. 3

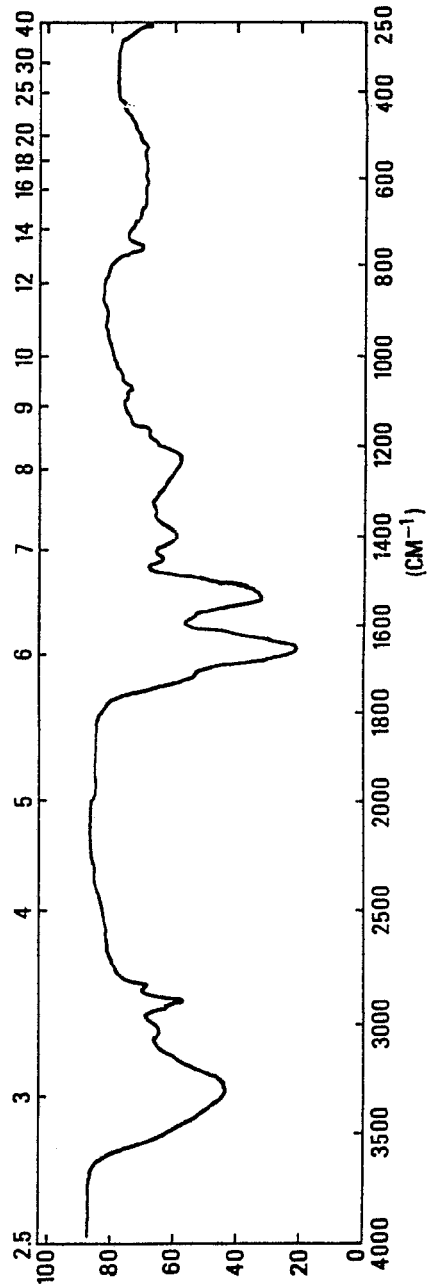


FIG. 4

ESCALA VARIABLE  
Madrid 16 de Octubre de 1.979  
BERNARDO UNGRÍA

*[Handwritten signature]*

ELI LILLY AND COMPANY

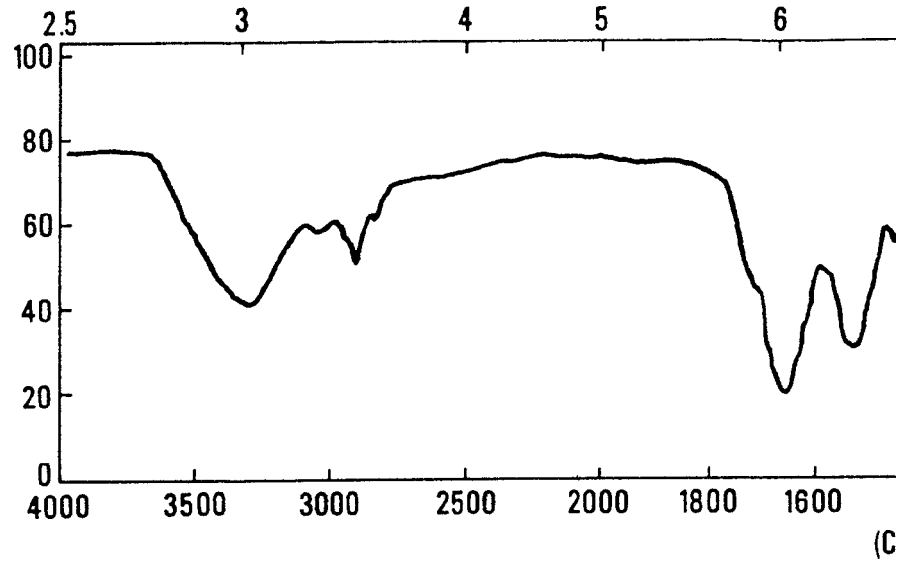


FIG. 3

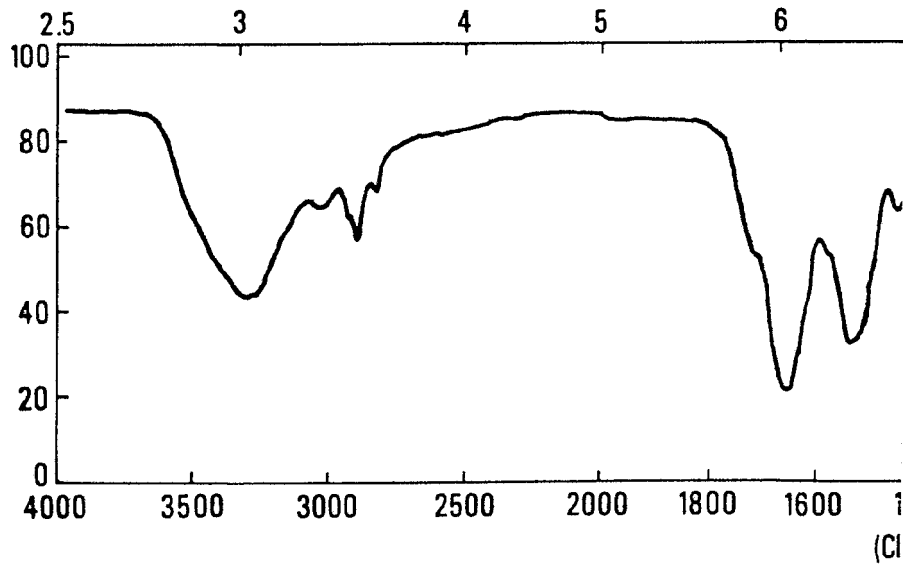


FIG. 4

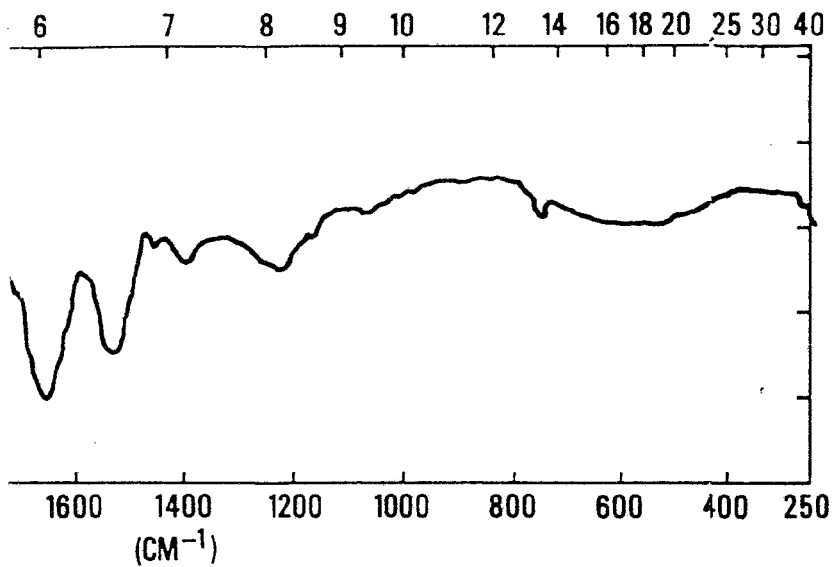


FIG. 3

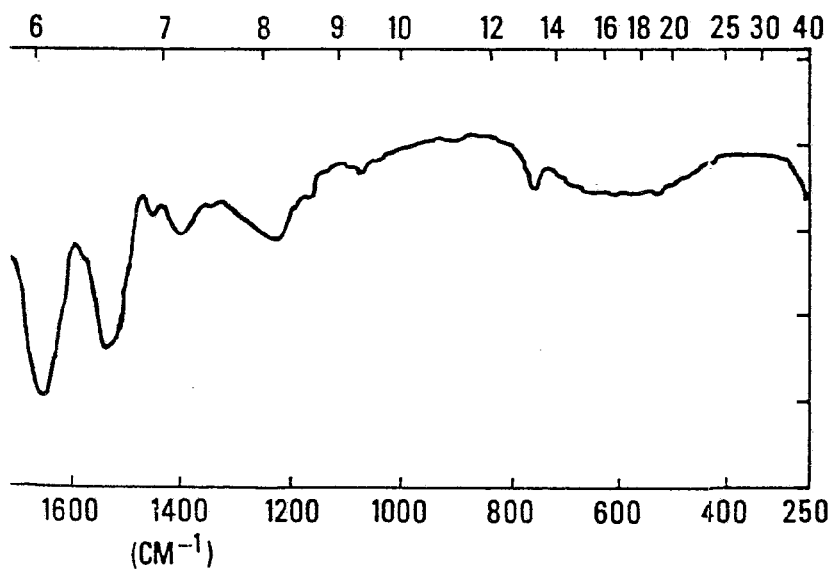


FIG. 4

ESCALA VARIABLE  
Madrid 16 de Octubre de 1.979  
BERNARDO UNGRÍA

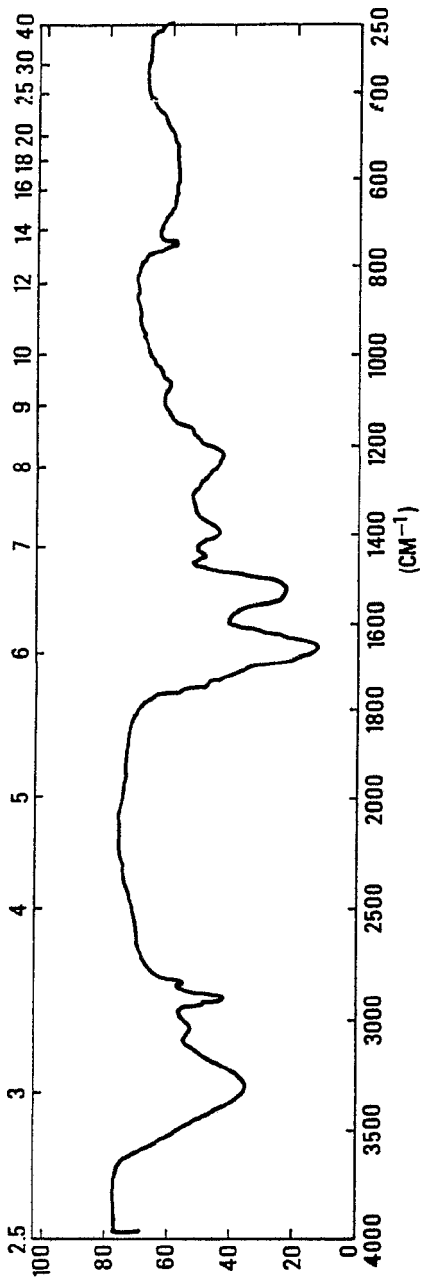


FIG. 5

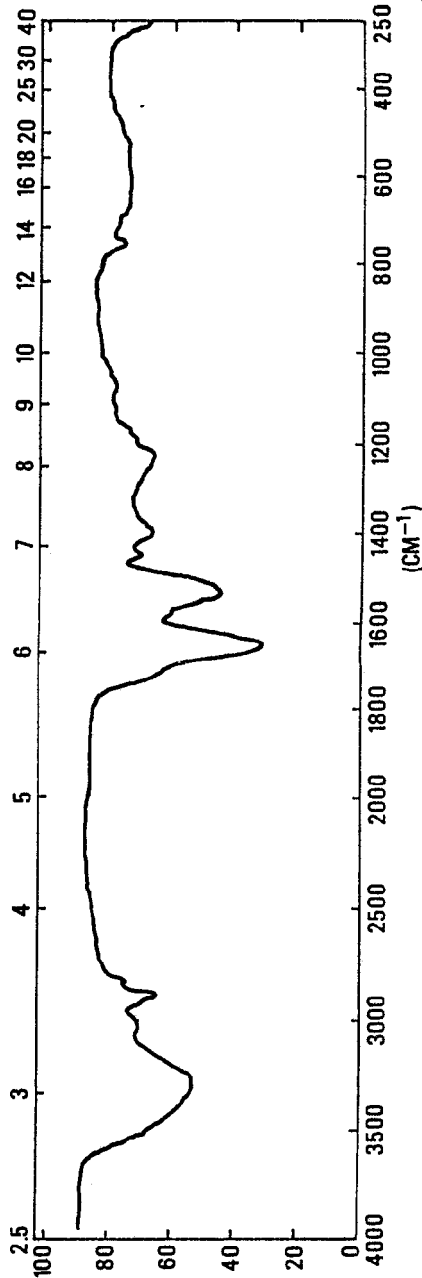


FIG. 6

ESCALA VARIABLE  
Madrid 16 de Octubre 1979  
BERNARDO UNGUELA  
P. 19.

ELI LILLY AND COMPANY

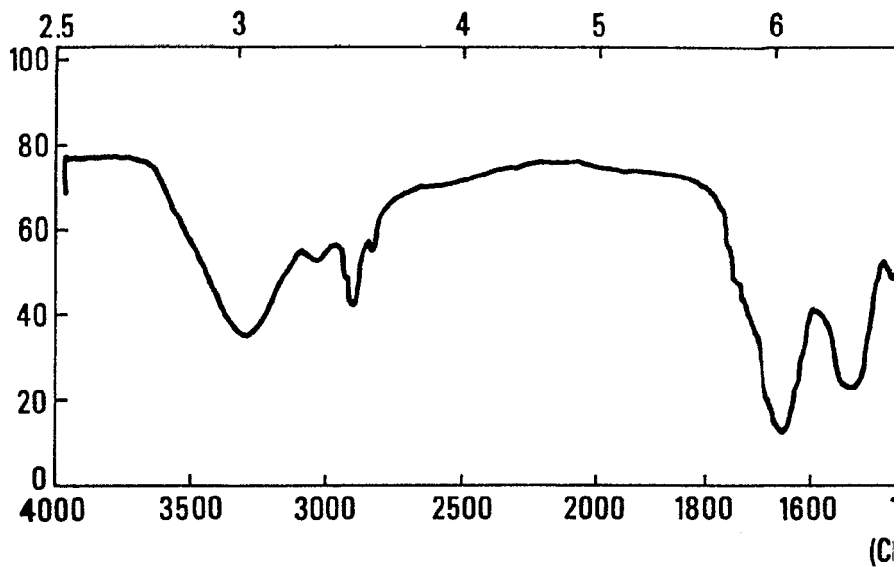


FIG. 5

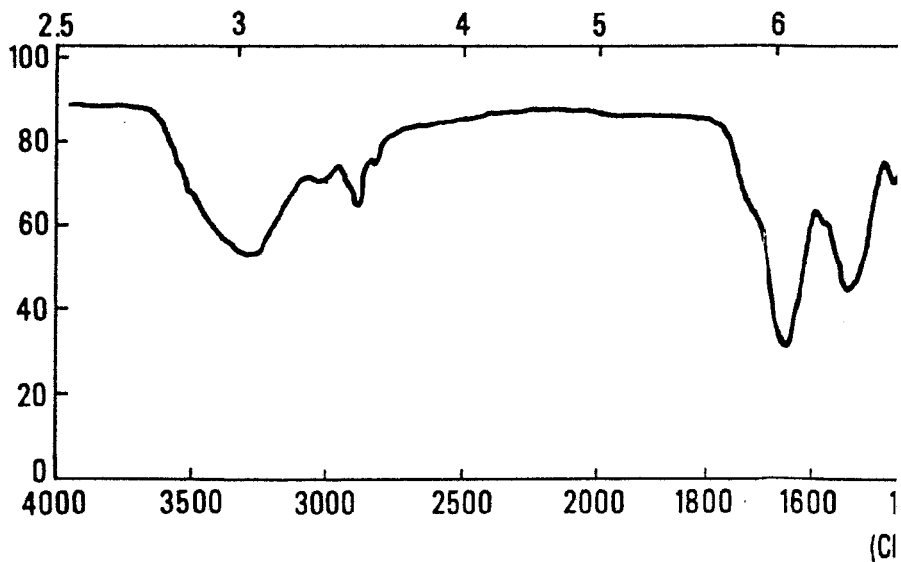


FIG. 6

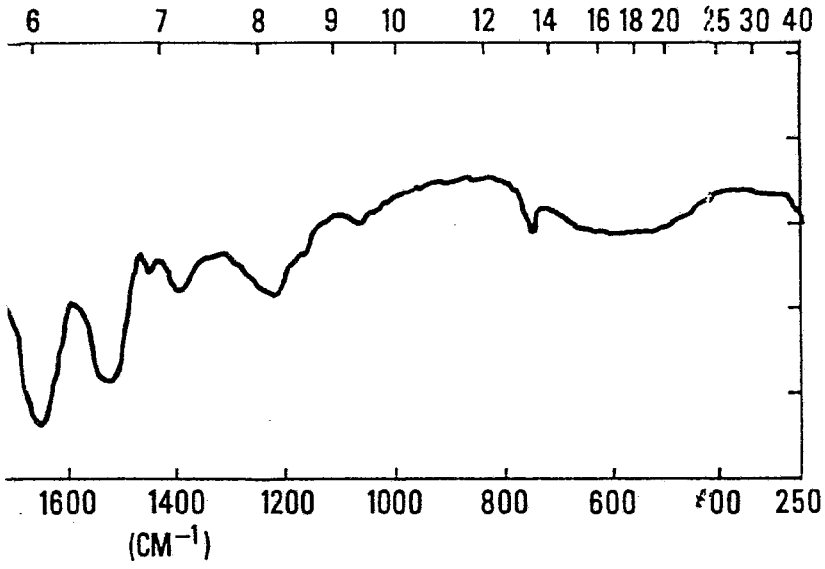


FIG. 5

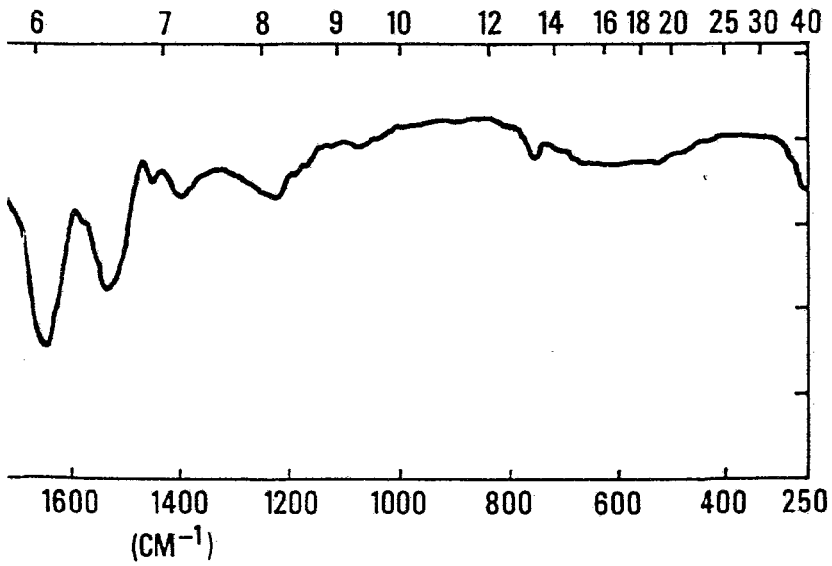


FIG. 6

ESCALA VARIABLE

Madrid 16 de Octubre 1979

BERNARDO UNGRIA

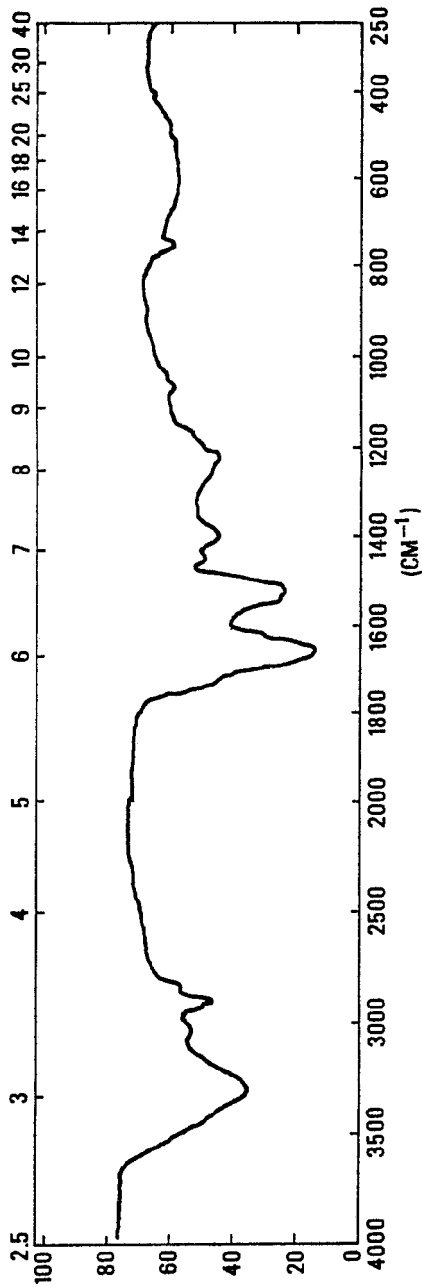


FIG. 7

ESCALA VARIABLE  
Madrid 16 de Octubre 1.979  
FERNANDO UNGRIA

ELI LILLY COMPANY

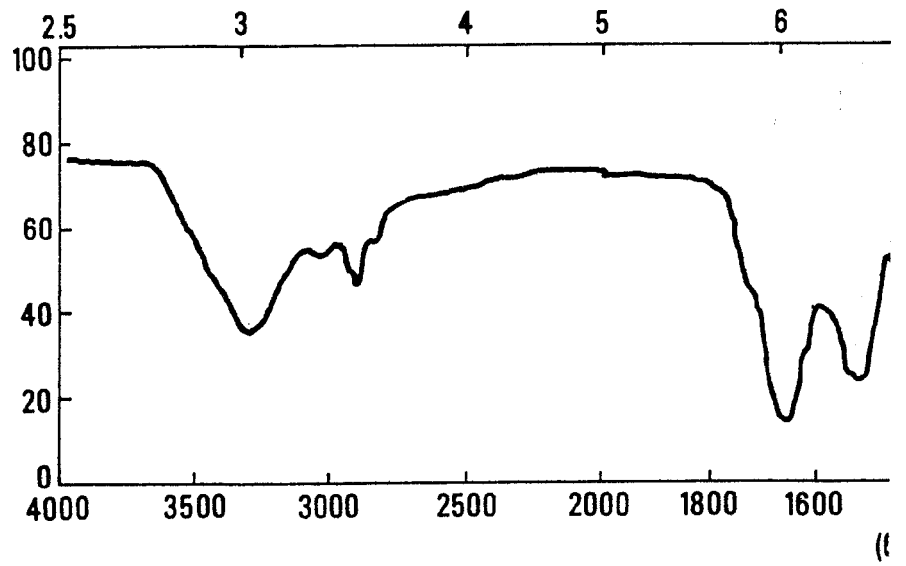


FIG. 7

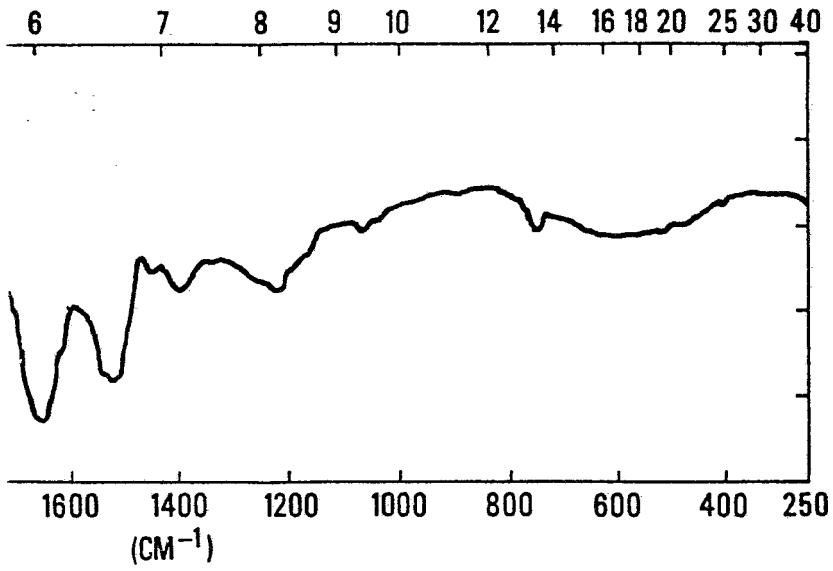


FIG. 7

ESCALA VARIABLE

Madrid 16 de Octubre 1.979

BERNARDO UNGRIA