

222 188



222188

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a

la solicitud de

una PATENTE DE INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA

a favor de

BRISTOL LABORATORIES INC, de nacionalidad norteamericana,  
domiciliada en SYRACUSE I - N.Y, Thompson Road (Estados  
Unidos)

p o r

" UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ANFOMICINA "

(Prioridad de la patente norteamericana  
nº. 434.608, de 4 junio de 1954)

//////



La presente invención se refiere a perfeccionamientos en la producción del antibiótico llamado Anfomicina, que ha sido ya el objeto de la Patente nº 206.514 del mismo solicitante.

- 5.- En los dibujos que se acompañan, la Fig. 1 muestra la curva de absorción infrarroja de la sal cálcica del antibiótico suspendido en forma sólida en un aceite de hidrocarburo (Nujol), indicándose la longitud de onda en centímetros recíprocos. Esta muestra, según análisis, contenía el 47.9% de carbono, el 6.3% de hidrógeno, el 12.25% de nitrógeno, el 9.5-10.0% de agua (datos incorrectos de humedad) y el 12.9% de residuos (aproximadamente el 7.7% de CaO y el 5.2% de  $\text{CaSO}_4$ ). Suponiendo que sean cuatro grupos carboxílicos, el residuo de CaO teórico para un peso molecular de aproximadamente 1500 es del 7.5% de CaO. La difracción por rayos X de esta muestra indicó un orden inferior de cristalinidad. En el espectro infrarrojo, la ancha banda de 1130 centímetros recíprocos probablemente se debe al  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
- 10.-
- 15.-
- 20.- En Antibiotics and Chemotherapy, Vol. III, Nº 12, páginas 1239-1242, Diciembre 1953, se publica una descripción más amplia de este organismo y de la Anfomicina.
- 25.- El organismo se caracteriza por un micelio negativo bien ramificado. Se observan numerosas espirales flojamente enrolladas cuando es cultivado a 30°C. sobre agar de extracto de carne-asparagina (carbohidrato, 10 grs.; asparagina, 0.5 grs.; extracto de buey, 2 grs.;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 gr.; agar, 15 grs., y agua destilada, 1 litro) que contiene un 1% de glicerol, sacarosa o maltosa. Las esporas esferoidales se producen en cadenas y miden de 1.0 a 1.2  $\mu$  de anchura y de 1.6 a 1.8  $\mu$  de longitud.
- 30.- Las siguientes características de cultivo se observan sobre varios medios (Waksman, S.A. : The Actinomycetes, Chronica Botanica, Waltham, Mass. , 1950) a 30°C. durante catorce días.
- 35.- Tapón de patata; abundante crecimiento de color crema; ligero obscurecimiento color café rojizo de la patata, ningún micelio aéreo.
- Agar asparagina glucosa: abundante crecimiento; mico-



222188

40.- lio substrato de color crema que se torna color café bermejo por envajecimiento; abundante micelio aéreo de color gris pizarra; fuertemente esporulado; pigmento soluble de color ámbar.

45.- Agar malato cálcico (malato cálcico, 10 grs.;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.5 gr.; agar, 20 grs., y agua destilada, 1 litro): crecimiento moderado; micelio substrato dorado; escaso micelio aéreo; ningún pigmento soluble.

50.- Agar Czapek-Dox: crecimiento moderado; micelio substrato arrugado de color café amarillento; escaso micelio aéreo; ningún pigmento soluble.

55.- Agar de Bennett (Jones, K.L.: aislamiento fresco de actinomicetes en el cual la presencia de micelios aéreos esporógenos es de caracter fluctuante, J. Bact. 57:141, 1949): crecimiento moderado; micelio substrato arrugado dorado; micelio aéreo color gris amarillento poco denso; pigmento soluble de débil color café amarillento.

60.- Agar Emerson (Baltimore Biological Labs.): abundante crecimiento; micelio substrato color ámbar; abundante micelio aéreo color marfil; fuertemente esporulado; pigmento soluble pardusco.

Agar dextrosa nutriente: abundante crecimiento; micelio substrato amarillo; micelio aéreo blanco y hasta ligeramente amarillento; fuertemente esporulado; pigmento soluble de color amarillo débil.

65.- Agar dextrosa de patata: moderado crecimiento arrugado; micelio bronceado; escasas hifas aéreas; pigmento soluble color ámbar.

Se observan las siguientes reacciones bioquímicas cuando se cultivan sobre los substratos que se relacionan a continuación:

70.- Leche de tornasol: Alcalina, sin coagulación; ligera peptonización en 14 días.

Palo de gelatina: Moderada liquefacción a 26°C. en 14 días; ningún pigmento soluble.

75.- Almidón: Hidrolisis en 96 horas a 30°C.

Nitrato: Reducción a nitrito en 96 horas a 30°C. en medio sintético.

Puentes de carbono: Sobre agar inorgánico de Pricham (Pricham, T.G. and Gottlieb, F.; La utilización de compuestos



- 80.- de carbono por algunos actinomicetales como ayuda para determinación especial, J. Bact. 56:107, 1948) como medio base se observó crecimiento a 28°C. en 10 días, con las siguientes como fuentes de carbono únicas: arabinosa, ramosa, xilosa, dextrosa, galactosa, fructosa, maltosa, sacarosa, dextrina, inulina, rafinosa, almidón soluble, glicerol, inosita, celobiosa, lactosa, manita y salicilato sódico. No se observó crecimiento con dulcita, sorbita, acetato sódico, citrato sódico, formiato sódico, malato sódico, oxalato sódico, tartrato sódico y succinato sódico.
- 85.-
- 90.- S. canus se desarrolla abundantemente en 23-30°C en cultivo sumergido agitado y aerado. Produce 300-500 ug./ml de Anfomicina, en aproximadamente 50 horas, al ser cultivado en el siguiente medio: 1% de harina de agua de soja, 1% de d-glucosa, 0.5% de NaCl, 0.05% de soluble seco de destilería, y 0.1% de CaCO<sub>3</sub>. La Anfomicina se ensaya contra Bacillus subtilis (A.T.C.C. 6633) por el método de placa cilíndrica. Los ensayos de dilución serial no han resultado muy satisfactorios.
- 95.-
- 100.- El antibiótico se extrae fácilmente del agua en n-butanol a pH 2-4 y a partir de n-butanol a agua a pH 7-9. El coeficiente de distribución varía con la concentración de antibiótico. Estas propiedades han sido utilizadas para aislar el antibiótico de los caldos de cultivo. El material preparado por procedimientos de extracción disolvente puede ser cristalizado por reacción de la sal sólida amorfa con cloruro cálcico en agua, produciendo una sal cálcica insoluble en el agua, cristalina y pobremente definida.
- 105.-
- 110.- La Anfomicina es un polipéptido ácido con un punto isoeléctrico de 3.5-3.6. Es soluble en el agua y los alcoholes inferiores, e insoluble en los disolventes no polares.
- 115.- El antibiótico da ninhidrina negativa por los ensayos Sakaguchi, Molisch y Ehrlich-Pauly. El ensayo biuret resulta positivo. La hidrólisis ácida da un producto con valores aumentados de amino-nitrógeno Van Slyke y un ensayo de ninhidrina positiva. De tales hidrolizados pueden separarse varios materiales de reacción-ninhidrina por cromatografía de papel o cromatografía por intercambio de io-



120.- nes. La Anfomicina es ópticamente activa, y la magnitud de la rotación específica depende del pH de la solución. Un máximo de  $[\alpha]_D^{25} / 7.5 \pm 0.5$  (c = 1, agua) se encuentra en pH 6, disminuyendo a pH mayor o inferior. El antibiótico es estable en solución acuosa durante por lo menos un mes a un pH neutro y temperatura ambiente. Exclusivamente presenta absorción final en el ultravioleta y da un espectro infrarrojo típico de un polipéptido. La Anfomicina es sumamente activa de superficie, en especial en soluciones acuosas a pH 4.5-7.5.

125.- Las determinaciones analíticas sobre la sal cálcica ácida y cristalina dan los siguientes resultados:

- Sal cálcica:  
Encontrado: O. 51.6; H. 6.45; N. 13.02; Ca. 4.8
- Acido libre:  
Encontrado: C. 54.4; H. 7.19; N. 14.2

130.- La titulación de Anfomicina o sus sales indica la presencia de un sólo grupo de amino libre con un pK de 9.0. Tres o cuatros grupos ácidos con curvas pK sobrepuestas están presentes. El peso molecular mínimo calculado a partir de la titulación del grupo básico es 1400-1500.

135.- La Anfomicina fué ensayada contra varios microorganismos sobre agar de infusión cardiaca por el método de vetas de Waksman t Reilly (Waksman, S.A. and Reilly, H.C.: Método de vetas de agar para el ensayo de substancias antibióticas. Indust. Engin. Chem., Anal. Ed. 17:556, 1945). Los resultados obtenidos se dan en la Tabla I. Se observará que la Anfomicina es activa contra las bacterias grampositivas, con poca o ninguna actividad contra bacterias gramnegativas o la levadura Candida albicans.

140.- **TABLA I**  
**Concentraciones inhibidoras mínimas de Anfomicina**

Organismo	Concentración ug./ml.
Micrococcus pyogenes var. aureus .....	2.5
Gaffkya tetragena .....	5
Streptococcus pyogenes C2C3+ .....	2.5
Atreptococcus agalactiae .....	1.25
Streptococcus dysgalactiae .....	1.25
Streptococcus uberis .....	2.5

(Cont.)



222 188 2

160.-	(Continuación.)	
	Diplococcus pneumoniae+	2.5
	Lactobacillus acidophilus	10
	Lactobacillus casei	5
	Lactobacillos leichmannii	0.5
165.-	Bacillus anthracis	0.5
	Bacillus cereus var. mycoides	0.5
	Bacillus subtilis	5
	Corynebacterium xerosis	0.25
	Salmonella typhosa	> 100
170.-	Eschericha coli	> 100
	Shigella sonnei	> 100
	Klebsiella pneumoniae	> 100
	Proteus vulgaris	> 100
	Pseudomonas aeruginosa	> 100
175.-	Candida albicans	> 100

+ Ensayada sobre medio de agar sanguíneo

180.- La intravenosa LD<sub>50</sub> de la sal cálcica cristalina de Anfomicina administrada a los ratones en solución acuosa del 0.5% era 120.2 mg./Kg. (≅ 13.2 mg.) con inclinación de 11.8. No hubo muertos retardados.

185.- La Anfomicina protegió eficazmente a los ratones infectados por inoculación intraperitoneal con 100 LD<sub>50</sub> de Diplococcus pneumoniae. El tratamiento por vía intraperitoneal en el momento de la infección dió un CD<sub>50</sub> de 0.49 mg./Kg.; por vía intravenosa, 3.33 mg./Kg., y por vía oral 125 mg./kg.

190.- Su potente actividad antibacteriana en combinación con su elevada actividad superficial la hace sumamente útil como agente tóxico, a la vez para infección de animales y plantas.

Purificación con sal de Reinecke

195.- Veinticinco granos de la sal sódica de Anfomicina se disolvieron en 100 ml. de agua, acidificando con ácido fosfórico a pH 2. Esta solución fue extractada con 250 ml. de n-butanol. El extracto húmedo de butanol se trató con 25 grs. de carbón vegetal activado (Darco G-60) durante media hora y se filtró. El filtrado fue extractado con 500 ml. de agua a pH 7.0. La capa de agua se concentró

222188



200.-

ligeramente in vacuo para separar el butanol, ajustándose a pH 1.9 con ácido fosfórico. Veinticinco gramos de sal de Reinecke en 200 ml. de agua se ajustaron a pH 1.9 y agregaron a la solución de Anfomicina. El precipitado resultante se separó por filtración después de reposar durante la noche en el refrigerador. El precipitado se volvió a disolver en agua ajustándolo a pH 7.0 y precipitándolo por el ajuste a pH 2.0. El material precipitado, separado por filtración, fué lavado con agua, disuelto en 150 ml. de acetona y filtrado. Se agregó 1 litro de acetona y se concentró con hidróxido amónico a pH 7.5, precipitando la sal amónica de la Anfomicina. El material se lavó y se secó. Rendimiento: 12.4 gramos.

205.-

El material se lavó y se secó. Rendimiento: 12.4 gramos.

210.-

Los ensayos de placa de difusión dieron los siguientes datos

Los ensayos de placa de difusión dieron los siguientes datos

Material 1:16 dil.- 1:64 dil.- 1:256 dil.-

215.-

Material inicial, 1/mg/ml.: 25.3 mm : 20.7 mm : 16.0 mm.

Producto final, 1/mg/ml. : 26.0 mm : 21.8 mm : 17.5 mm.

220.-

La Anfomicina producida según los procedimientos anteriormente citados se caracteriza esencialmente, aun cuando esté contaminada por productos químicos orgánicos similares, por su "espectro" de actividad (es decir, valor del grado de emigración o de  $R_f$ ), utilizando una serie de disolventes en el procedimiento conocido por cromatografía de tiras de papel. Esta técnica constituye un procedimiento relativamente nuevo, aunque ya bien establecido, para la identificación de los compuestos orgánicos; puesto que con infrarroja máxima, los valores  $R_f$ , en una serie de sistemas de disolventes, constituyen una característica única y reproducible de un determinado producto químico, y sirven como una "huella dactilar".

225.-

El procedimiento empleado es el siguiente. Tiras de papel filtro altamente retentivo, exento de ceniza y denso (v.g., 589 Blue Ribbon Special de Carl Schleicher & Schnell Co., Keene, N.H.), de media pulgada de anchura y 58 cms. de largo se suspenden, a temperatura ambiente constante, dentro de un área protegida (v.g., dentro de un matraz grande) desde el borde de una cubeta. La parte superior de la tira se encuentra en contacto continuo con un suministro de sistema disolvente (también llamado fase de

230.-

El procedimiento empleado es el siguiente. Tiras de papel filtro altamente retentivo, exento de ceniza y denso (v.g., 589 Blue Ribbon Special de Carl Schleicher & Schnell Co., Keene, N.H.), de media pulgada de anchura y 58 cms. de largo se suspenden, a temperatura ambiente constante, dentro de un área protegida (v.g., dentro de un matraz grande) desde el borde de una cubeta. La parte superior de la tira se encuentra en contacto continuo con un suministro de sistema disolvente (también llamado fase de

235.-



- 240.- revelado) dentro de la cubeta; la parte inferior de la tira cuelga libremente y no alcanza el suministro del sistema de disolventes (o los componentes volátiles del mismo) colocado debajo de las tiras colgantes para facilitar la saturación del aire con el disolvente en uso.
- 245.- El producto a examinar (v.g., en un caldo de fermentación o como sólido aislado) se coloca en un lugar marcado en la parte superior de esta porción de la tira que cuelga libremente en el aire. En el caso de un sólido, éste se diluye en cualquier disolvente útil. Las cantidades utilizadas son las que proporcionan un tamaño de zona conveniente sobre el ensayo final, según se determina por una simple prueba. Por ejemplo, una cantidad útil es 5 microlitros (0.005 ml.) de una solución que contiene 100 mgm/ml. de agua de Anfomicina para ensayar vs. *B. subtilis*. La tira se seca y luego se coloca en posición en la cubeta, la cual contiene el sistema de disolventes seleccionado. El disolvente se permite emigrar hacia abajo, es decir, para relevar la tira, hasta que la parte delantera del disolvente alcance la parte inferior de la tira. Esto requiere
- 250.- requiere aproximadamente 15 horas; la atmósfera circundante se mantiene a temperatura constante y exenta de corrientes, saturada de vapor de disolvente procedente de un depósito situado en la parte inferior.
- 255.- A continuación se extrae la tira, se seca al aire y se coloca sobre una bandeja de agar de pH controlado (en este caso 6.2) inoculado con un organismo de ensayo, en este caso *B. subtilis*). Después de reposar en el refrigerador durante la noche, se separan las tiras y se señalan las bandejas para su identificación, incubándolas durante
- 260.- la noche, y son leídas bien sea directamente o fotografiadas para conseguir un registro permanente.
- 265.- El contorno de toda la tira queda visible. La situación de cada agente antibiótico sobre la tira se señala por una superficie clara, que contrasta con la superficie
- 270.- turbida donde se desarrolló el organismo. La tira, según se indica en la fotografía, se divide en zonas que representan 5, 10, 10, 10, 10, 10, 10, 10 y 15 por ciento de la distancia desde el punto de aplicación de la muestra hasta el fondo, respectivamente, y estas zonas se descri-
- 275.-



280.- ban como poseedoras de valores  $R_f$  de 1 a 10 inclusive. Una pequeña mancha, precisamente en el centro, por consiguiente, tendría un valor  $R_f$  de 6, mientras que una mancha mayor se extendería dentro de las zonas adyacentes y tendría valores  $R_f$  de 5, 6 y 7 al considerar la zona íntegra.

285.- Al utilizar esta técnica, el espectro  $R_f$  de Anfomicina se comprueba que se presenta como sigue, utilizando 5 microlitros de una solución acuosa de 100 mgm./ml. como muestra y ensayando con *B. subtilis* en agar a pH. 6.2 en los doce sistemas de disolventes:

290.-

Sistema disolv.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Valor $R_f$	7-9	5-8	des-comp.	1-4	1	8-10	7-10	8,9	7-9	2-5	2-4	1

295.-

La composición de estos sistemas de disolventes es como sigue:

A = Agua.

300.- B = Citrato sódico acuoso al 10% (algunas veces la Anfomicina se descompone en este sistema).

C = Citrato sódico acuoso al 40%

D = Butanol saturado de agua.

E = Cetona de metil-isobutílico seco.

305.-

F = Una mezcla de 100 partes de metanol al 80% y 10.5 partes de piperidina ajustada a pH 9.5 con ácido acético.

G = Una mezcla por volumen de 80 partes de metanol, 5 partes de ácido acético glacial y 15 partes de agua.

H = Butanol saturado de agua y que contiene un 2% de ácido p-tolueno sulfónico.

310.-

I = Una mezcla de 100 ml. de butanol saturado de agua y 5 ml. de ácido acético glacial.

J = Butanol saturado de agua y que contiene un 2% de ácido p-tolueno sulfónico y un 2% de piperidina.

315.-

K = 100 partes de butanol saturado de agua y 2 grs. de ácido p-tolueno sulfónico + 2 ml. de piperidina + 2 grs. de ácido láurico.

L = Una mezcla de 2 partes de alcohol isoamílico y 1 parte de cloroformo, saturado de citrato sódico acuoso al 10%. En este caso, antes de aplicar la muestra, las tiras se



320.- saturan con citrato sódico acuoso al 10% ajustado a pH 5.7 con ácido cítrico y se secan.

325.- En los dibujos, las figs. 2 y 3 representan trazos exactos, reducidos a aproximadamente el 50% en cada dimensión, de las fotografías sacadas de las placas de agar utilizadas para obtener el espectro R<sub>p</sub> del lote 1 de Anfomicina. Los dibujos demuestran la situación de las tiras y el punto de situación de la Omegamicina (mancha de actividad antibacteriana). La tira, tal como originalmente se suspendió, se representa en el dibujo según se lee desde la parte superior de la derecha hacia el fondo, y luego, continuando desde la parte superior de la izquierda hacia el fondo; las tiras se cortan en mitades antes de ser colocadas dentro de las bandejas de agar, puesto que son casi dos veces más largas que las bandejas. El valor R<sub>p</sub> obtenido y la letra, indicada arriba, identifican el sistema de disolventes utilizado, y se dan en los dibujos debajo de cada tira.

330.- En un estudio clínico de veinte pacientes de distintas dermatosis, una aplicación tópica, dos o tres veces al día, sobre las regiones afectadas durante periodos que variaban de siete días a nueve semanas, de un unguento que consistía en óxido de cinc, estearato de cinc, petrolato líquido y un 0.5% de Anfomicina, no produjo indicios de irritación primaria cualquiera ni desarrollo subsiguiente de sensibilización a este preparado. Además, nueve de estos pacientes observaron una mejoría clara de las dermatosis después del empleo de este unguento. Este preparado era tolerado sin indicio alguno de sensibilización por varios de estos pacientes que habían desarrollado sensibilidades a numerosas materias previamente aplicadas, tales como benzocaina, butesina, picrato, bioformo, fenol, bálsamo del Perú, histadilo, surfacaina y resorcina.

345.- Estas dermatosis comprendían las siguientes condiciones:

- |       |                          |                        |
|-------|--------------------------|------------------------|
| 350.- | Neurodermatitis          | Hiperhidrosis          |
|       | Eczema numular           | Eczema solare          |
|       | Dermatitis atópica       | Dermatitis exfoliatriz |
|       | Eczema dishidrosis       | Paroniquia (pustular)  |
|       | Líquen plano             | Soriasis               |
|       | Dermatitis medicamentosa | Lupus                  |
|       | Dermatitis venenata      | Miliaria Rubra         |



360.- Un cultivo del organismo vivo BL 567201 que ha sido aislado del suelo e identificado como Streptomyces viridifaciens ha sido depositado en la Colección Americana de tipos de cultivo de Washington D.C. y ha sido agregado a su colección permanente de microorganismos como ATCC 11859.

365.-

N O T A

En resumen: la Patente de Invención cuyo registro se solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

- 370.- 1) Un procedimiento para la producción de Anfomicina, caracterizado porque comprende cultivar una especie de Streptomyces canus en una solución acuosa de carbohidrato saturada de nutriente nitrogenado bajo condiciones aeróbicas sumergidas hasta conferir actividad substancialmente antibacteriana a dicha solución, y luego recuperar la Anfomicina así producida del caldo de fermentación.
- 375.- 2) Un procedimiento para la producción de Anfomicina, caracterizado porque comprende cultivar una especie de Streptomyces canus en una solución acuosa de carbohidrato saturada de nutriente nitrogenado bajo condiciones aeróbicas sumergidas a una temperatura de unos 24°C. a aproximadamente 30°C. durante un periodo de aproximadamente dos a siete días, hasta conferir actividad substancialmente antibacteriana a dicha solución, y luego recuperar la Anfomicina así producida del caldo de fermentación.
- 380.- 3) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la recuperación de la Anfomicina incluye la fase de decoloración de soluciones de Anfomicina mediante carbón activado.
- 385.- 4) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la recuperación de la Anfomicina incluye la fase de extraer el antibiótico en un disolvente inmiscible en el agua seleccionado del grupo que consiste en alcoholes butílicos y alcoholes amílicos en un pH inferior a 3.5 a aproximadamente la temperatura ambiente.
- 390.- 5) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la recuperación de la Anfomicina incluye la fase de precipitar la Anfomicina de una solución acuosa por ajuste del pH a un punto dentro del alcance de pH
- 395.-

222 188



400.- de 3.0-4.0.

6) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la recuperación de la Anfomicina incluye la fase de precipitar la Anfomicina de una solución acuosa por ajuste del pH a un punto dentro del alcance de pH 3.4-3.5.

405.-

7) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la recuperación de la Anfomicina incluye la fase de separar impurezas de una solución acuosa fuertemente ácida de Anfomicina por extracción de las impurezas con un miembro seleccionado del grupo que consiste en acetato de metilo, isobutilo, cetona y anilo.

410.-

8) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la recuperación de la Anfomicina incluye la fase de extraer la Anfomicina de una solución en aproximadamente la temperatura ambiente con un pH inferior a 3.5 en butanol por el empleo de agua con un pH superior a 4.

415.-

9) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la recuperación de la Anfomicina incluye la fase de precipitar la Anfomicina de solución por formación de derivados insolubles de la función básica.

420.-

10) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la recuperación de la Anfomicina incluye la fase de precipitar la Anfomicina de solución por la formación de derivados insolubles de la función ácida.

425.-

11) Un procedimiento, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la recuperación de la Anfomicina incluye la fase de extraer el antibiótico de solución en un disolvente orgánico inmiscible en el agua seleccionado del grupo que consiste en alcoholes butílicos y alcoholes amílicos dentro de agua cuyo pH es mayor de 6.0.

430.-

12) Un procedimiento, según la Reivindicación 2), que incluye la obtención de una sustancia, eficaz para inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas, seleccionadas del grupo que consiste en una sustancia anfótera soluble en el agua, que exhibe solubilidad mínima en agua entre pH 3.0 y 4.0, que es fácilmente soluble en metanol como la forma ácida y como la forma salina, que es soluble en alcoholes superiores exclusivamente en la forma ácida, que es susceptible de ser extraída de agua a pH 2 mediante butanol

435.-



- 440.- y pentano $\bar{a}$ , que no puede ser extraída de agua a pH 2 por acetato de metilo, isobutilo, cetona, éter bencénico, etilo y acetato amílico, que produce derivados sólidos antibacterialmente activos de hidróxido amónico y de sal de Reinecke, que absorbe luz ultravioleta únicamente en la región de 210-230  $\mu$ , que exhibe respuesta negativa a la ninhidrina por los ensayos Sakaguchi, Molisch y Ehrlich-Pauly, que es estable durante al menos diez días en solución acuosa de pH 2 a 10, y susceptible de formar sales con ácidos y metales, y teniendo el siguiente espectro de valores  $R_f$ , y las sales ácidas y metálicas de dicha substancia:
- 445.-
- 450.-

Sistema disolv.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Valor $R_f$	7-9	5-8	des-comp.	1-4	1	8-10	7-10	8,9	7-9	2-5	2-4	1

- 455.- La composición de estos sistemas de disolventes es como sigue:
- A = Agua.
- B = Citrato sódico acuoso al 10% (algunas veces la Anfomicina se descompone en este sistema).
- 460.- C = Citrato sódico acuoso al 40%
- D = Butanol saturado de agua.
- E = Cetona de metil-isobutílico seco.
- F = Una mezcla de 100 partes de metanol al 80% y 10.5 partes de piperidina ajustada a pH 9.5 con ácido acético.
- 465.- G = Una mezcla por volumen de 80 partes de metanol, 5 partes de ácido acético glacial y 15 partes de agua.
- H = Butanol saturado de agua y que contiene un 2% de ácido p-tolueno sulfónico.
- 470.- I = Una mezcla de 100 ml. de butanol saturado de agua y 5 ml. de ácido acético glacial.
- J = Butanol saturado de agua y que contiene un 2% de ácido p-tolueno sulfónico y un 2% de piperidina.
- K = 100 partes de butanol saturado de agua y 2 grs. de ácido p-tolueno sulfónico + 2 ml. de piperidina + 2 grs. de ácido láurico.
- 475.- L = Una mezcla de 2 partes de alcohol isocamílico y 1 parte de cloroformo, saturado de citrato sódico acuoso al 10%. En este caso, antes de aplicar la muestra, las tiras se



480.-

saturan con citrato sódico acuoso al 10% ajustado a pH 5.7 con ácido cítrico y se secan.

13) Un procedimiento, según la Reivindicación 9), que incluye la obtención de una sal cálcica de la sustancia anfótera.

485.-

14) Un procedimiento, según la Reivindicación 10), que incluye la obtención de un fosfato de la sustancia anfótera.

15) Un procedimiento, según la Reivindicación 10), que incluye la obtención de un sulfato de la sustancia anfótera.

490.-

16) Un procedimiento, según la Reivindicación 10), que incluye la obtención de un clorhidrato de la sustancia anfótera.

495.-

17) Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ANFOMICINA".

Todo conforme queda descrito en la presente Memoria, que consta de catorce páginas escritas a máquina y los dibujos que se acompañan.

Madrid, a de Noviembre de 1955

ALFONSO UNGRIA