

OCT. 1968

PATENTE DE INVENCION

Case 5787/E.

331998

Memoria Descriptiva

sobre:

"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DEL ANTIBIOTICO
A 28829".

Solicitante: CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza, residente en
Basilea, Suiza.

El objeto de la invención es un procedimiento
para la obtención del antibiótico que a continuación se
denomina Antibiótico A 28829.

El nuevo compuesto se forma en el cultivo
5. de una nueva cepa de la clase Streptomyces antibio-



ticus (Waksman y Woodruff), Waksman y Henrici 1950, que se aisló de una muestra del suelo de las cercanías de Bourébo (Beoumi), Costa de Marfil, y que en nuestros laboratorios, así como en la Eidg. Technische

5. Hochschule, Instituto para Botánica Especial, Zurich, se guarda bajo la denominación A 28829. La cepa está depositada bajo la denominación NRRL 3207 en el Northern Regional Research Lab., US-Department of Agriculture, Peoria, Illinois.
10. La cepa *S. antibioticus* A 28829 forma un micelio de substrato delgado, rico en ramificaciones, de hifas de 0,6 hasta 0,8 μ de grueso, de las cuales se forman hilos de micelo de aire de aproximadamente 1 μ de ancho, que forman esporas endógenas. Las esporas
15. son elipsoides, de tamaño 0,6 - 1,4 x 0,5 - 1,2 μ , con superficie lisa, o como máximo ligeramente verrugosa. Las cadenas de esporas están monopodialmente ramificadas, con ramas laterales rectas u onduladas. Al crecer sobre caldo peptónico se observa una decoloración melanoide. El micelo del substrato es amarillo claro, marrón amarillento hasta marrón claro, gris amarronado hasta marrón oscuro. El micelo de aire esbaterciopelado, al principio blanco o gris blancuzco, en estado
20. maduro marrón grisáceo hasta gris amarronado o gris ceniza (cinereus). La cepa crece seróbicamente a temperaturas de 18-40°, especialmente 27-37°C. Es sensible a las lisozimas.
- 25.

Para su ulterior caracterización se describe a continuación el crecimiento sobre distintos caldos de cultivo. Los caldos de cultivo N° 5, 6, 7 y 10 se

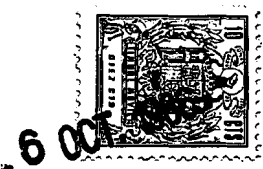
30.



- prepararon según W. Lindenbein, Arch. Mikrobiol. 17, 361 (1952); los N° 3 y 9 según Pridham et al., Antibiot. Ann 1956/57, pág. 947; el N° 1 según Gause et al., "Probleme der Klassifizierung von Actinomyceten- Antagonisten" (ruso), Nat. Verlag Medzig-Moscú 1957, pág. 22; el N° según Tresner y Danger, J. Bact. 76, 239 (1958); el N° 4 según el Manual of Methods of Pure Culture Study of Bacteria, Geneva N.Y. 44-9-10 (1946) 54-14; el N° 8 según Ettliger et al., Arch. Mikrobiol. 31, 326 (1958); (El Cromogeno-Agar contiene: 1 g de triptona, 1 g de extracto de levadura (Difco), 1 g de extracto de carne (Lab-Lemco), 8,5 g de cloruro sódico, 17 g de agar-agar, 1000 ml aq.dest.).
5. 1. Substrato mineral : Crecimiento fino, en forma de
10. 15. 2. Peptona-hierro-agar : Crecimiento rugoso, amarillo blancuzco, ningún micelo de aire; substrato sin colorear.
20. 3. Extracto de levadura-Agar : Crecimiento fino, en forma de velo hasta rugoso, gris amarronado hasta marrón oscuro, micelo de aire aterciopelado, gris amarronado; substrato sin colorear.
25. 4. Caldo de nitrato : Crecimiento anular pustuloso, amarillo blancuzco hasta amarillo claro, micelo de aire muy escaso formando un revestimiento pulverulento, gris blancuzco, substrato coloreado de amarillo hasta marrón claro; fuerte reducción de
30. nitrato.



5. Glucosa-asparagina-agar : Crecimiento fino en forma de velo, amarillo claro hasta marrón claro, micelo de aire escaso, aterciopelado, amarillo blancuzco hasta carmín pálido o gris amarronado; substrato sin colorear.
5. Punción de gelatina (27°C) : Crecimiento superficial en forma de punto, marrón claro, micelo de aire harinosamente espolvoreado, gris blancuzco, substrato coloreado marrón oscuro, licuación 1 cm. después de 5 días, 5 cm. después de 10 días.
10. Placa de almidón : Crecimiento fino en forma de velo, marrón claro, micelo de aire harinosamente espolvoreado hasta aterciopelado, gris amarronado, substrato sin colorear, hidrólisis después de 10 días 5 mm.
15. Cromogeno-agar : Crecimiento fino en forma de velo, amarillo blancuzco, micelo de aire escaso, formando un revestimiento pulverulento, gris blancuzco, formación de melanina.
20. Harina de avena de Carvajal-agar : Crecimiento fino, en forma de velo, gris blancuzco hasta gris amarronado; substrato sin colorear, micelo de aire aterciopelado gris amarronado.
25. Leche de tornasol : Crecimiento anular rugoso, marrón oscuro, micelo de aire escaso formando un revestimiento pulverulento, gris blancuzco; substrato marrón oscuro; peptonización, pero sin embargo coagulación escasa solamente; pH después de 10 días 7,5.
30. Se emplearon las siguientes fuentes de carbono:



d-glucosa, l-arabinosa, sacarosa, d-xilosa, i-inositol, d-manita, d-fructosa.

5. En sus características esenciales la cepa 28829 concuerda con el S. antibioticus (Waksman y Woodruff), Waksman y Henrici 1948. En la tabla 1 a continuación se comparan las propiedades características de la cepa 28829 y la cepa tipo de la S. antibioticus Cepa IMRU 3435:

TABLA 1.

10.	Cepa 28829	Cepa IMRU 3435
Morfología de las esporas	Esporas lisas, elipsoides	Esporas lisas, elipsoides
Color del micelo de aire	cinereus	cinereus
15.	Morfología del micelo de aire	Cadenas de esporas monopodialmente ramificadas, rectas u onduladas
Cadenas de esporas monopodialmente ramificadas, rectas u onduladas		
20.	Capacidad para la formación de melanina	Existe
Existe		
25.	Color del micelo del substrato	Amarillo claro, marrón, amarillento, marrón oscuro, gris amarronado.
Marrón amarillento, marrón claro, amarillo anaranjado, gris verdoso.		

30. El antibiótico A 28829 se forma en el cultivo del S. antibioticus A 28829 o de otra cepa que muestre esencialmente las mismas propiedades. Para la obtención del antibiótico A 28829 se cultiva aerobicamente el S. anti-



5. bioticus A 28829 o un microorganismo que muestre sus propiedades en un caldo de cultivo acuoso que contenga una fuente de carbono y de nitrógeno, así como sales inorgánicas, hasta que el caldo de cultivo muestre un efecto esencialmente antibacterial, y el antibiótico A 28829 se aisle a continuación del micelol.

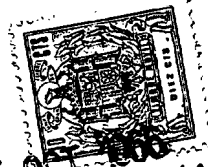
Para comprobar en los microorganismos las propiedades correspondientes al antibiótico A 28829 se puede emplear el ensayo con *Botrytis cinerea* más abajo descrito.

10. Para el cultivo se pueden emplear como fuentes de carbono y de nitrógeno por ejemplo, las siguientes: glucosa, sacarosa, fructosa, fécula, manita, aminoácidos, por ejemplo, glicina, péptidas, proteínas y sus productos de disociación, tales como peptona o triptona, extractos de carne, partes solubles en agua de granos de cereales, tales como maíz o trigo, residuos de destilación de la fabricación de alcoholes, Cornsteep-liquor, levadura, semillas, especialmente de las plantas colza, soja y algodón, sales amónicas y nitratos. Como sales inorgánicas puede contener el caldo de cultivo, por ejemplo, cloruros, carbonatos, sulfatos, nitratos, fosfatos de metales alcalinos y alcalinos-térreos de magnesio, cinc, manganeso y hierro.
- 15.
- 20.

25. El cultivo se efectúa aerobícamente, por ejemplo, en cultivo de superficie en reposo o preferentemente en forma submersa, bajo agitación o removiendo con aire u oxígeno en botellas de agitación o en los fermentadores conocidos. La temperatura más adecuada es de 27 hasta 37°C. El caldo de cultivo muestra por lo general un efecto esencialmente antibacterial después de 2 - 5
- 30.



- días. Preferentemente se cultiva en varias etapas, es decir, primeramente se prepara un cultivo previo en caldo líquido que después se traslada por inyección al medio de producción propiamente dicho, por ejemplo, en
5. proporción 1:20. El cultivo previo se obtiene, por ejemplo, traspasando por inyección un micelo de esporas obtenido en medio de cultivo sólido durante unos 14 días de crecimiento a un caldo líquido y dejándole crecer durante 48 horas.
10. El aislamiento del antibiótico del caldo de cultivo, es decir, del micelo, se efectúa según métodos convencionales teniendo para ello en consideración las propiedades químicas, físicas y biológicas del antibiótico. Para determinar el efecto antibiótico en las distintas etapas de aislamiento -así como también en los
15. medios de cultivo- resultan como organismos de ensayo especialmente adecuado el *Botrytis cinerea*. Las hifas de este microorganismo son morfológicamente modificadas por el antibiótico A 28829 (fuerte ramificación de un lugar determinado, de manera que se forman estructuras en forma de escoba). El ensayo se efectúa, por ejemplo, como ensayo de difusión en placas como sigue:
20. En el centro de placas de agar de malta se inyecta una superficie circular de 5 mm de diámetro con *Botrytis cinerea* y las placas se incuban durante 2-3 días
25. a 24°C. Durante este período de tiempo crece el micelo a un tamaño de 20-30 mm de diámetro. Una solución de la substancia a comprobar se coloca mediante discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro a unos 5 mm de distancia
30. del borde del micelo. Las placas se incuban entonces du-



rante 24 - 36 horas a 24°C. En las soluciones activas se puede observar una modificación morfológica de las hifas hasta una distancia de 24 mm del disco de papel de filtro. Las soluciones con una concentración de

5. 20 \sqrt /ml antibiótico A 28829 dan hifas más claramente modificadas.

El antibiótico A 28829 muestra las siguientes propiedades químicas y físicas.

10. Es una sustancia lipofila, neutra cristalina incolora que entre otros se disuelve en metanol, etanol, acetona, acetato etílico, cloroformo, éter y éter de petróleo. En metanol cristaliza en barritas que funden a 223-227°C bajo descomposición.

15. El análisis elemental de: C = 60,53 %; 60, 79%; 60,97%; H = 8,52%, 8,76%; 8,52%; N = 1,89% B = 1,35%; 1,18%; O (calculado) = 27,49 %.

El peso molecular (Método termoelectrico, disolvente cloruro metilénico) asciende a aproximadamente 868.

20. El espectro infrarrojo en bromuro potásico muestra, entre otras, bandas en 3420, 2915, 2880, 1735, 1630, 1515 (escalón), 1465, 1370, 1328, 1287, 1263, 1222, 1202, 1178, 1127, 1100, 1070, 995, 923, 890 (escalón) 846, 795, 780, 757, 719 cm^{-1} (véase figura 1).

El espectro NMR está representado en la figura 2.

25. El espectro de absorción ultravioleta no muestra ningún máximo entre 210 y 400 m μ .

30. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice, con acetato etílico, se forma una única mancha, $R_f = 0,75$; demostración mediante rociado con ácido sulfúrico concentrado y calentamiento a 140° o bioautográ-



ficamente con espicaria.

Al calentar el antibiótico con ácido clorhídrico diluido a 100°C durante 30 minutos no se forma ningún azúcar reductor demostrable mediante nitrato de plata amoniacal o hidrogenoftalato de anilina.

5.

El antibiótico A 28829 posee un buen efecto antibiótico contra los microorganismos gramo-positivos, por ejemplo, Bac.subtilis, y contra hongos, por ejemplo, Candida vulgaris, Paecilomyces varioti, Spicaria. En la tabla 2, a continuación, se especifica el efecto inhibidor de distintas concentraciones de antibióticos contra estos microorganismos en el ensayo de difusión en placas (diámetro de un disco de papel de filtro impregnado con una solución de antibiótico 6 mm). Se indica cada vez el diámetro de la zona de inhibición para la concentración de antibiótico correspondiente.

10.

15.

TABLA 2

	Microorganismo	Diámetro de las zonas con una concentración de antibiótico de		
		1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,01 mg/ml
20.	Bac.subtilis (sobre caldo de cultivo natural)	22 mm	16 mm	11 mm
	Bac.subtilis (sobre caldo de cultivo sintético)	33 mm	18 mm	10 mm
25.	Candida vulgaris	10 mm		
	Sacharomyces cerevisise	10 mm		
	Paecilomyces varioti	28 mm	15 mm	9 mm
	Spicaria sp.	21 mm	18 mm	11 mm



- Ante todo se destaca, sin embargo, el nuevo antibiótico por su efecto químico-terapéutico contra protozoos parásitos, especialmente plasmodios y piroplasmos, tales como babesias, babesielos y teilerios.
5. También son activos contra aquellos plasmodios que son resistentes a los agentes antimalaria conocidos. El nuevo antibiótico se puede emplear, por lo tanto, farmacológicamente en el animal o como medicamento contra, por ejemplo, la malaria, babesiosis, teileriosis, anaplasmosis y otras infecciones. Asimismo se pueden emplear como aditivo a los piensos. Además se puede utilizar como agente de desinfección o como agente de conservación o para combatir los hongos en las plantas.
- 10.
- El efecto quimioterapéutico contra los protozoos de las clases Plasmodium y Babesia se puede demostrar como sigue:
15. 1ª) Contra Plasmodium berghei.
- El antibiótico se ensayó en ratones Albino que se infestaron cada vez con una cepa de P.berghei, es decir, con una cepa normal sensible a los medicamentos y una cepa hecha resistente contra el 7-cloro-4-(4-dietilamino-1-metil-butilamino)-quinolin-difosfato. Los ratones recibieron en la fecha de la infección, y en cada uno de los tres días siguientes, una vez al día, una dosis disuelta del antibiótico (véase tabla 3). Un día después de terminado el tratamiento se contaron los parásitos en una película delgada de sangre. La densidad de los parásitos en los ratones tratados y en los ratones no tratados (control) está indicada en la tabla 3. ED₅₀ es aquella dosis que reduce el número de los parásitos
- 20.
- 25.
- 30.



en los ratones tratados en comparación con el control en un 50 %.

TABLA 3.

5.	Dosis (mg/kg)	Número de ratones tratados.	Densidad de los parásitos en % de los controles.
	0 (control)	30	100
	1	20	75 ± 16
	3	20	42 ± 17
	10	20	0,03 ± 0,03

10. El ED₅₀ se calcula por interpolación gráfica en 2,2 ± 1,0 mg/kg.

El ED₅₀ correspondiente para una cepa resistente al derivado quinolínico arriba mencionado es de 2 ± 0,6 mg/kg.

1b) Contra Plasmodium gallinaceum.

15. Un ensayo análogo se efectuó en pollitas (50 g de peso) que se infectaron con un patógeno de la malaria gallinácea P. gallinaceum. En este ensayo se empleó el antibiótico dos veces al día por vía oral en forma de una suspensión. Las películas de sangre se evaluaron un

20. día después de terminado el tratamiento. La tabla 4 muestra el resultado.

TABLA 4.

25.	Dosis (mg/kg)	Número de pollitas tratadas	Densidad de los parásitos en % de los controles.
	0 (Control)	15	100
	2	10	64
	6	20	86
	20	21	0,4
30.	60	10	0

6 OCT.



El ED₅₀ se calcula por interpolación en aproximadamente 7 ± 4 mg/kg.

2) Contra Babesia rodhaini.

5. Ratones albino se infectaron con B. rodhaini y el antibiótico se ensayó por vía oral, como descrito para P.berghei. Los resultados se muestran en la tabla 5.

TABLA 5.

Dosis (mg/kg)	Número de ratones tratados	Densidad de los parásitos en % de los controles
0 (Control)	30	100
1	15	89
3	15	43
10	15	0

15. Mediante interpolación se determina el ED₅₀ en 2,4 ± 1,7 mg/kg.

20. La toxicidad del antibiótico se determinó mediante medición del LD₅₀, es decir, de la dosis que mata un 50% de los animales. El LD₅₀ de una solución del antibiótico aplicado por vía oral en 4 días consecutivos es de 15 mg/kg. El índice terapéutico es mas favorable que en los quimioterapéuticos comparables.

25. De acuerdo con el ensayo de arriba se obtiene para el tratamiento de la malaria en las personas una dosis diaria de 2 - 5 mg o una fracción de la misma.

30. El antibiótico A 28829 se puede emplear como medicamento, por ejemplo, en forma de preparados farmacéuticos. Estos contienen el compuesto mencionado en mezcla con material excipiente orgánico o inorgánico, farmacéutico, adecuado para aplicación enteral o paren-



- teral. Para los mismos entran aquellos materiales en consideración que no reaccionan con los nuevos compuestos, tal como por ejemplo, gelatina, lactosa, fécula, estearato de magnesio, aceites vegetales, alcoholes bencílicos u otros excipientes medicinales conocidos.
5. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar, por ejemplo, como tabletas, grageas, polvos, supositorios o en forma líquida como soluciones, suspensiones o emulsiones. En caso dado estarán esterilizados y/o contendrán adyuvantes, tales como agentes de conservación, estabilización, humectación o emulsión. Asimismo pueden contener otros materiales terapéuticamente valiosos. Además se puede emplear el antibiótico como agente de desinfección y conservación, así como para combatir los hongos de las plantas.
- 10.
- 15.

La invención se describe en los ejemplos siguientes. Las temperaturas se indican en grados centígrados.

Ejemplo 1 -

20. a) La cepa *Streptomyces antibioticus* A 28829 se cultiva sobre agar de levadura (composición: 4 g de extracto de levadura Difco, 10 g de extracto de malta Difco, 4 g de dextrosa, 20 g de Bactoagar Difco, aq. dest. ad 1000 ml).
25. a 28°. Después de 14 días se ha formado un micelo bien esporeado. Este se suspende en solución fisiológica de cloruro sódico. Con esta suspensión de micelo de esporas (0,5% en volumen) se inyectan 500 ml de caldo de cultivo que se encuentran en un matraz de Erlenmayer de 2 litros y que por litro de agua de la red contiene 20 g de
30. harina de soja sin desgrasar y 20 g de manita. La sus-



- pensión se incuba durante 48 horas a 28° bajo agitación en una máquina agitadora de rotación a 120 rpm.
- b) Con 1,5 litros de un cultivo previo obtenido como anteriormente descrito, se inyectan 30 litros de caldo de cultivo de la composición indicada para el cultivo previo que se encuentran en fermentadores de 50 litros y cuyo pH se ha ajustado antes de la esterilización (20 minutos a 125°) a 7,8. Se incuba el cultivo agitado a 700 - 900 rpm. durante 72 horas a 28° y 1 atmósfera de sobrepresión ventilando con 30 litros de aire por minuto. Después se separa el micelo del caldo de cultivo y de éste se aísla el antibiótico A 28829, según el procedimiento descrito más abajo.
- c) Un cultivo preparado, según el procedimiento descrito bajo b), pero incubado solamente durante 36 horas se puede emplear para inyectar un fermentador más grande (300 litros de caldo de cultivo) en proporción en volumen de 1:20 y el cultivo así obtenido emplearlo para la inyección de un fermentador con 3000 litros de caldo de cultivo, asimismo en proporción en volumen de 1:20.
- d) 3200 litros de medio de cultivo del pH 6,3 se mezclan con 64 kg de Hyflo-Supercel y se filtra. El filtrado claro se desecha. La mezcla húmeda de micelo y Hyflo-Supercel se agita dos veces, cada una con 640 litros de acetona acuosa al 80% durante 30 minutos, y a continuación se centrifuga. El centrifugado (1560 litros) se libera bajo condiciones benignas de la acetona, el residuo (530) litros se mezcla con 82,5 kg de cloruro sódico y a un pH de 5,9 se extrae con éster acético en proporción de volumen 3:1 en un extractor de contracorriente. El
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



- residuo acuoso se vuelve a mezclar con 82,5 kg de cloruro sódico y se extrae en igual forma. Los extractos reunidos (570 litros) se concentran cuidadosamente a 10 litros. El residuo oleoso se disuelve en 50 litros de éter de petróleo (p. eb. 50-70°) y la solución éter de petróleo se extrae 8 veces, cada una con 6 litros de metanol al 85%. Los extractos metanólicos contienen toda la substancia antibióticamente activa. Al evaporar hasta secar se obtienen 640 g de antibiótico en bruto
5. A 28829.
- 10.

Ejemplo 2 -

- El micelo obtenido, según el ejemplo lb) se extrae tres veces, cada una con 1000 ml de éster acético, los extractos reunidos se concentran a 500 ml y el concentrado se agita 3 veces con ácido acético diluido, agua, solución diluida de bicarbonato sódico y agua. La solución éster acética secada sobre sulfato sódico se evapora en vacío hasta secar. El residuo contiene según el ensayo con Botrytis cinerea casi toda la actividad del medio de cultivo. 7,09 g del residuo se someten a la extracción según Graig a través de 100 estadios. El sistema de disolventes empleado para ello contiene por 3 litros de tetracloruro de carbono 2,55 litros de metanol y 0,45 litros de agua. La substancia se llena con 150 ml de mezcla de disolventes en los tres primeros vasos de un aparato totalmente automático. El antibiótico se enriquece en los estadios 10 - 22. Estas fracciones se reúnen y en vacío se evaporan hasta secar. Se obtienen 2,39 g de una espuma amarronada, sólida, que después de recibir en éter
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



cristaliza ámpliamente.

Ejemplo 3 -

- 20 g de antibiótico en bruto se disuelven en cloroformo absoluto y se cromatografía en una columna de 500 g de gel de sílice. El antibiótico se eluye con aproximadamente 2000 ml de éster acético. Al concentrar por evaporación a 200 ml se precipitan 14,75 g de cristales incoloros. Otros 1,95 g se obtienen de las lejías madre.
5. Recristalizado en metanol funde al antibiótico a 223-227° (descomposición).
- El análisis elemental de : C = 60,53%; 60,79%; 60,97%; H= 8,52%; 8,76%; 8,52%; N = 1,89%; ; B = 1,35%; 1,18%; O (calculado) = 27,49%.
10. El peso molecular (método termoeléctrico, disolvente cloruro metilénico) asciende aproximadamente 868 .
- En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice, en acetato etílico, se forma una única mancha, Rf = 0,75; demostración mediante rociado con ácido sulfúrico concentrado y calentamiento a 140° o bioautográficamente con Spicaria como sigue:
20. Sobre una placa de agar, que está inyectada con gérmenes de Spicaria, se coloca un papel de filtro y encima la placa de capa delgada desarrollada. Después de 15 minutos se ha difundido suficiente antibiótico en el agar para producir una inhibición del crecimiento. Se retira la placa de capa delgada y el papel de filtro y la placa de agar se incuba durante 20 horas a 36°.
25. 20 mg de ivomicina se disuelven en 2 ml de dioxano y con 2 ml de solución N de ácido clorhídrico,
- 30.



- se calienta durante 30 minutos al baño María. La solución se neutraliza mediante adición de carbonato de bario sódico, se evapora hasta secar y el residuo se comprueba por cromatografía en papel con el sistema n-butanol-ácido acético glacial-agua (4:1:1). No se pueden demostrar azúcares reductores ni con nitrato de plata amoniacal ni con hidrogenoftalato de anilina.
- 5.

10.

N O T A

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Suiza con fecha y número siguientes: 8 de octubre de 1965, nº 13926/65; 19 de septiembre de 1966, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor y siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España sobre: "Procedimiento para la obtención del antibiótico A 28829"; caracterizándose por lo siguiente:
- 15.
- 20.

- 1.- Procedimiento para la obtención del antibiótico A 28829, caracterizado porque la cepa *Streptomyces antibioticus* A 28829, u otra cepa formadora del antibiótico A 28829, se cultiva en un caldo de cultivo acuoso, que contenga una fuente de carbono y de nitrógeno, así como sales inorgánicas, hasta que éste muestre esenciales propiedades antibacteriales y a continuación
- 25.
- 30.



se aísla del micelo el antibiótico. A 28829.

2^a.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque para comprobar la presencia del antibiótico se emplea *Botrys cinerea*.

5. 3^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a y 2^a, caracterizado porque el cultivo se efectúa bajo condiciones aeróbicas, preferentemente submersas.

10. 4^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a a 3^a, caracterizado porque el micelo se extrae con un disolvente lipóide miscible con agua.

5^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a a 4^a, caracterizado porque el micelo se extrae con acetona acuosa.

15. 6^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a a 4^a, caracterizado porque el micelo se extrae con éster acético.

7^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a a 6^a, caracterizado porque el antibiótico se limpia mediante repartición en contra-corriente.

20. 8^a.- Procedimiento según la reivindicación 7^a, caracterizado porque la repartición en contra-corriente se efectúa en un sistema de tetracloruro de carbono-metanol-agua.

25. 9^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1^a a 8^a, caracterizado porque el antibiótico se limpia por cromatografía.

10^a.- Procedimiento según la reivindicación 9^a, caracterizado porque la cromatografía se efectúa en gel de sílice.

30. 11^a.- Procedimiento según las reivindicaciones



9ª y 10ª, caracterizado porque como medio de elución se emplea éster acético.

5. 12ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 11ª, caracterizado porque el antibiótico se reprecipita en metanol.

13ª.- Procedimiento para la obtención del antibiótico A 28829; tal y como queda descrito sustancialmente en la presente Memoria, e ilustrado en los dibujos adjuntos.

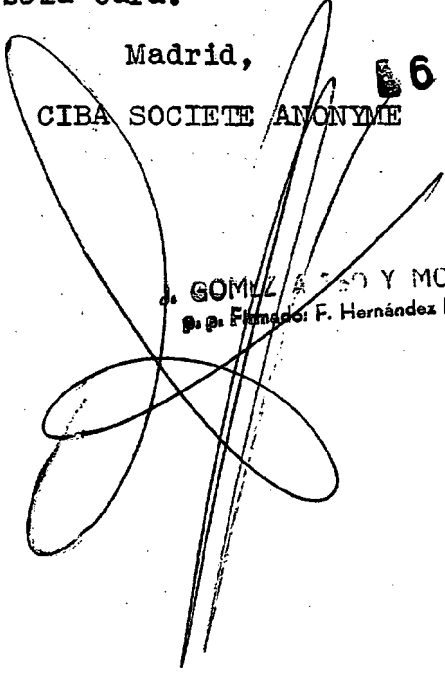
10. Esta Memoria consta de 19 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

CIBA SOCIÉTÉ ANONYME

6 OCT. 1966

J. GÓMEZ ASESOR Y MODELO
p. p. Firmado: F. Hernández Ruiz



331098

331098

FIG.1

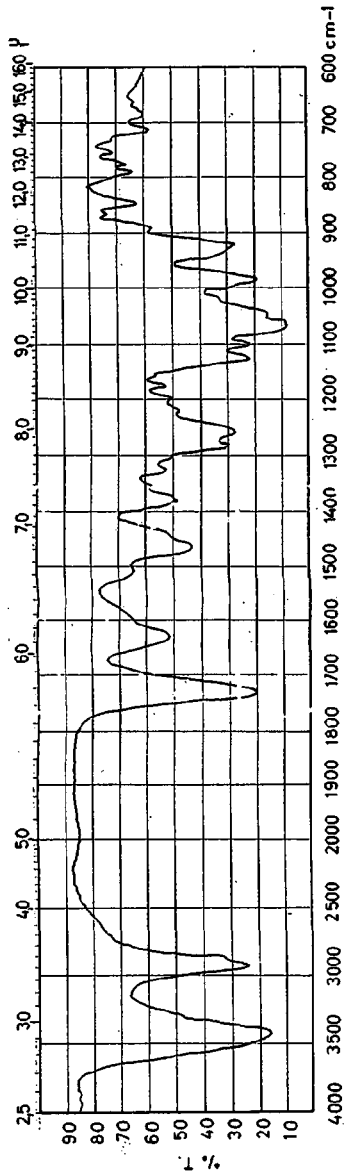
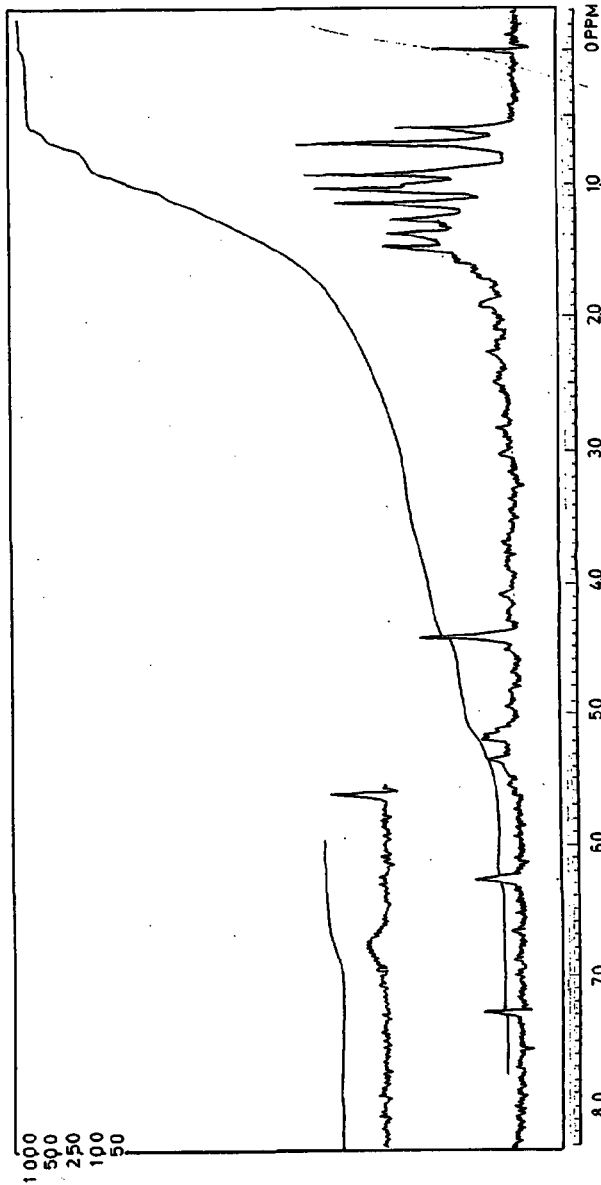
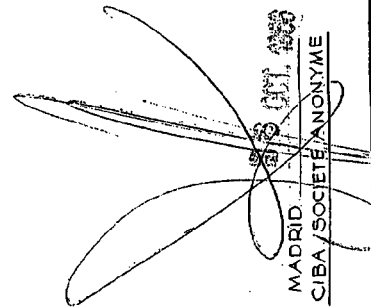


FIG.2



ES
VARIABLE



MADRID
CIBA SOCIETE ANONYME