



-5 AGO

SECRETARIA DE ECONOMIA
DIRECCION GENERAL DE PATENTES
CLASIFICACION: C-12
SUBCLASIFICACION: D

382489

382489

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY.

RESIDENCIA: 307 East McCarty Street,

INDIANAPOLIS, Indiana, U.S.A.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION
DE ANTIBIOTICO A16884 O UNA SAL DEL
MISMO".

Prioridad: Patente estadounidense n.º 847.923 del 6-8-69.

382489



1 Este invento se refiere a la preparación del nuevo antibiótico A16884 y de sus sales.

5 El antibiótico A16884 es un nuevo antibiótico producido por fermentación de una variedad de Streptomyces lipmanii no descrita hasta ahora, productora de antibiótico A16884. Las sales de A16884 se obtienen fácilmente por reacción de A16884 con un ácido o base adecuados. El antibiótico A16884 y sus sales presentan actividad antibacteriana y antihelmíntica. La actividad antibacteriana es presentada contra los organismos Gram-negativos y Gram-positivos, así como contra los organismos patógenos para las plantas.

10 Más especialmente, este invento proporciona un procedimiento para la producción del antibiótico A16884 o una sal del mismo, cuya sal monosomónica está caracterizada como una sustancia blanca y amorfa, que se descompone alrededor de 180°C y es muy soluble en agua, soluble en dimetilsulfóxido, ligeramente soluble en alcoholes inferiores e insoluble en acetonitrilo; que es anfótera, con cuatro grupos valorables de $pK'a_1 = 3,9$; $pK'a_2 = 5,3$; $pK'a_3 = 9,2$ y $pK'a_4 = 10,5$ cuando se valora en dimetilformamida al 66 % a un pH inicial de 5,8; que tiene un peso molecular aparente de 435 aproximadamente, determinado a partir de los datos de la valoración; que tiene la composición aproximada de 44,01 % de carbono; 5,73 % de hidrógeno; 10,65 % de nitrógeno; 31,27 % de oxígeno y 6,86 % de azufre; que tiene una rotación óptica específica, $[\alpha]_D^{25}$ de +140,9° (c = 1 % en peso/volumen en agua); una suspensión en aceite mineral de la misma presenta las siguientes bandas perceptibles en su espectro de absorción infrarrojo a las si-

- 3 -
382489



1 guientes longitudes de onda, expresadas en micras: 3,18
(banda ancha), 5,66, 6,26, 6,57, 6,89, 7,15, 7,28, 7,40,
7,73, 8,00, 8,14, 8,79, 9,24, 9,65, 9,79 y 10,40; y que
da ensayos positivos con ninhidrina, reactivos de Pan
5 Dutscher, Benedict, Molisch, yodo y cloruro de dansilo y
ensayos negativos con los reactivos de Fehling, cloruro
férico, biuret y Sakaguchi; cuyo procedimiento consiste
en cultivar un organismo que es una variedad de Streptomy-
ces lipmanii NRRL 3584 productora del antibiótico A16884,
10 en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables
de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones
aerobias sumergidas, hasta que es producida una cantidad
sustancial de A16884 por dicho organismo en el citado me-
dio de cultivo.

15 El antibiótico A16884 es un antibiótico peptídico
que contiene azufre, con una molécula anfótera.

Como ocurre con muchos cultivos productores de
antibióticos, la fermentación de una variedad de Strepto-
myces lipmanii productora de antibiótico A16884 da lugar
20 a la producción de diversas sustancias antibióticas. El
antibiótico A16884 es una de estas sustancias. Otras sus-
tancias son relativamente inestables o se encuentran pre-
sentes solamente en cantidades muy pequeñas.

El antibiótico A16884 puede ser utilizado como tal
25 o en forma de sal, por ejemplo una sal de adición con áci-
do o una sal con un catión. En el caso de una sal con un
catión, la sal puede ser monosal o disal. Con frecuencia
se prefiere preparar las sales directamente en el proceso
de purificación de forma que el antibiótico se separa en
30 forma de sal. El antibiótico A16884 ha sido separado de

- 4 -
382489



-5

1 esta forma y por esta razón se caracteriza más adelante
como sal monoamónica.

La sal monoamónica del antibiótico A16884 es un
sólido blanco y amorfo, que se descompone a unos 180°C,
5 muy soluble en agua, soluble en dimetilsulfóxido (DMSO),
ligeramente soluble en alcoholes inferiores y esencialmen-
te insoluble en acetonitrilo y otros disolventes orgáni-
cos. El valor anterior de la rotación óptica específica
de la sal monoamónica del antibiótico A16884 está basado
10 en la sal, secada a la temperatura ambiente a vacío so-
bre cloruro cálcico anhidro, durante unas 15 horas.

La valoración electrométrica de la sal monoamóni-
ca del antibiótico A16884 en una solución al 66 % de dime-
tilformamida-agua a un pH inicial de 6,6 revela la presen-
15 cia de cuatro grupos valorables: $pK'a_1 = 3,5$; $pK'a_2 = 5,2$;
 $pK'a_3 = 9,2$ y $pK'a_4 = 10,3$. Por valoración similar de una
muestra posterior, con la excepción de que el pH inicial
es de 5,8, los valores respectivos son: $pK'a_1 = 3,9$;
 $pK'a_2 = 5,3$; $pK'a_3 = 9,2$ y $pK'a_4 = 10,5$. Cuando la sal mo-
20 noamónica del antibiótico A16884 se convierte en la forma
ácida, desaparece el $pK'a$ a 9,2. El peso molecular de la
sal monoamónica calculado a partir de los datos de la va-
loración es de 435 aproximadamente.

El análisis elemental de la sal monoamónica de
25 A16884, secada a vacío a unos 80°C sobre pentóxido de fós-
foro, dió los siguientes valores:

<u>Elemento</u>	<u>Porcentaje</u>
Carbono	44,01
Hidrógeno	5,73
Nitrógeno	10,65
Oxígeno	31,27
30 Azufre	6,86

382489



-5-

1 El análisis indica un contenido en metoxilo de 6,64 % y un contenido en acetilo de 9,23 % y un ensayo de Van Slyke para el nitrógeno amínico indica un 5,09 %.

5 El espectro de absorción infrarrojo de la sal monoamónica del antibiótico A16884 en una suspensión en acetate mineral se encuentra en la Figura 1 de los dibujos que acompañan a esta memoria. Las bandas perceptibles en el espectro infrarrojo sobre el intervalo de 2,0 a 15,0 micras son las indicadas anteriormente.

10 El espectro de absorción ultravioleta de la sal monoamónica del antibiótico A16884 en solución acuosa presenta máximos de absorción a 242 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 126$) y a 625 μ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 158$); también se mide el dicroísmo circular en una solución acuosa y presenta un efecto Cotton positivo a 263 μ y un efecto Cotton negativo a 236 μ .

15 La cromatografía en papel de la sal monoamónica del antibiótico A16884 sobre papel Whatman nº 1 da un valor R_f de 0,79 en un sistema disolvente de propanol, acetonitrilo y agua, en una relación en volumen de 1:1:1. Se obtienen bioautogramas colocando la cromatografía de papel sobre placas de ágar sembradas con organismos sensibles, como Salmonella gallinarum, como organismos de ensayo.

20 El espectro RMN del A16884 en D_2O presenta las siguientes características: 5,16 ppm (1H, simplete); 4,86, 4,68 ppm (2H, cuarteto AB, $J = 12,5$ Hz); 3,9-3,7 ppm (1H, multiplete); 3,67, 3,29 ppm (2H, cuarteto AB, $J = 18$ Hz); 3,53 ppm (3H, simplete); 2,6-2,3 (2H, multiplete); 2,10 ppm (3H, simplete); 2,1-1,6 ppm (4H, multiplete).

30 Se realizó también una cromatografía en papel de la sal monoamónica en otros sistemas disolventes, con los



382489

ES

1 siguientes resultados:

	Sistema disolvente	Valor R _F
	Etolanol/agua (80:20) con 1,5 % de cloruro sódico, papel impregnado con sulfato sódico 1N	0,58
5	Metanol/propanol/agua (6:2:1), -papel regulado con fosfato potásico 0,75 M, pH 4,0	0,21
	Propanol/piridina/ácido acético/acetonitrilo/agua (45:30:9:40:36)	0,40
	Alcohol terco-amílico/acetona/agua (2:1:2)	0,40
	Acetato de etilo/ácido acético/agua (3:1:1)	0,36
10	Metil-etil-cetona/agua (92:8), papel regulado con acetato sódico 0,1 N, pH 4,6	inmóvil
	Propanol/agua (70:30)	0,30
	Butanol saturado con agua	inmóvil
15	Butanol saturado con agua más 2 % de ácido p-toluensulfónico	0,60

15 Cuando la sal monoamónica de A16884 se somete a cromatografía en capa delgada sobre placas de gel de sílice en acetonitrilo acuoso al 70 %, utilizando como detector una rociada de ninhidrina, tiene un valor R_F de 0,47 aproximadamente; sobre placas de celulosa en acetonitrilo acuoso al 70 %, utilizando el mismo procedimiento para la detección, tiene un valor R_F de 0,45.

20 El análisis de aminoácidos de un hidrolizado ácido de antibiótico A16884, realizado por la técnica de Spackman-Moore-Stein, presenta dos tipos de reacción con ninhidrina, uno de los cuales es eluido idénticamente con glicina (0,758 micromoles/mg), y el otro es eluido inmediatamente antes de la glicina y es identificado como ácido α-aminoadípico (2,39 micromoles/mg). Por análisis similar

25

30 de una muestra posterior, los valores observados fueron

382489



1

5

10

15

20

25

30

0,49 micromoles/mg y 1,2 micromoles/mg, respectivamente.

Se han realizado diversos ensayos químicos cualitativos con el antibiótico A16884. El antibiótico A16884 da un ensayo positivo con los reactivos ninhidrina, Pan Dutscher, Benedict, Molisch, yodo y cloruro de dansilo, pero no con los reactivos de Fehling, cloruro férrico, biuret y Sakaguchi.

La sal monoamónica del antibiótico A16884 es estable a pH 3-9 a 5°C durante 8 días; relativamente estable a pH 3-9 a 25°C durante 4 días; e inestable a valores variables de pH a 100°C, dentro de un periodo de 5 minutos. La actividad biológica se pierde lentamente a pH 3-9 a una temperatura de 37°C, perdiéndose la mitad al cabo de 4 días.

El antibiótico A16884 tiene una acción inhibitoria contra el crecimiento de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los niveles a los cuales la sal monoamónica parcialmente purificada del antibiótico A16884 presenta inhibición contra el crecimiento de los organismos ilustrativos se encuentran en la Tabla I. Los niveles inhibitorios fueron determinados por el ensayo de dilución en ágar o por el ensayo de dilución en caldo (identificados en la tabla por las letras "d.a." y "d.c.", respectivamente).

En el ensayo de dilución en ágar, el organismo de ensayo se deposita formando una raya sobre una serie de placas de ágar que contienen diversas concentraciones de la sal monoamónica del antibiótico A16884 para determinar las concentraciones mínimas en mcg/ml (microgramos por mililitro) en el substrato de ágar, que inhiben el crecimiento del organismo durante un periodo de 48 horas (72 horas

382489



-5

en el caso de los organismos patógenos para las plantas).

En el ensayo de dilución en caldo, una serie de tubos conteniendo caldo nutritivo con concentraciones variables de la sal amónica del antibiótico A16884 se inoculan con el organismo de ensayo para determinar la concentración mínima de la sal monoamónica de A16884 en mcg/ml en el substrato de caldo que inhibe el crecimiento de organismos durante un periodo de 20 horas aproximadamente.

TABLA I

10	<u>Organismo de ensayo</u>	<u>Concentración inhibitoria mcg/ml</u>
	<u>Escherichia coli EC 0127</u>	6,25 d.a.
	<u>Proteus PR6</u>	1,56 d.a.
	<u>Proteus PR4</u>	3,12 d.a.
	<u>Salmonella typhimurium 54</u>	3,12 d.a.
15	<u>Salmonella typhosa T63</u>	1,56 d.a.
	<u>Staphylococcus aureus 3055</u>	50,00 d.a.
	<u>Staphylococcus aureus 3150</u>	>50,00 d.a.
	<u>Pseudomonas aeruginosa X239</u>	>50,00 d.a.
	<u>Salmonella flexneri SH3</u>	6,25 d.a.
20	<u>Klebsiella aerobacter K1</u>	6,25 d.a.
	<u>Klebsiella aerobacter KA14</u>	1,56 d.a.
	<u>Mycobacterium avium X85</u>	>50,00 d.a.
	<u>Streptococcus pyogenes C203</u>	3,12 d.a.
	<u>Bacillus subtilis X12.1</u>	3,12 d.a.
25	<u>Neurospora sp. M45-846</u>	>50,00 d.a.
	<u>Sarcina lutea X186</u>	6,25 d.a.
	<u>Escherichia coli EC0127</u>	7,80 d.c.
	<u>Klebsiella aerobacter KA14</u>	15,60 d.c.
	<u>Salmonella typhosa SA12</u>	31,20 d.c.

30 En ninguno de los ensayos anteriores se observó aglu

382489



- 5 100

1 tinación por el suero de caballo.

5 Como puede observarse en la tabla anterior, el antibiótico A16884 en forma de sal monosódica presenta actividad contra los organismos bacterianos Gram-positivos y Gram-negativos.

10 También se ha evaluado la actividad antibacteriana de una sal monosódica más purificada del antibiótico A16884, en un ensayo empleando la técnica de dilución en caldo antes descrita. Los resultados, expresados como el número mínimo de microgramos por mililitro requeridos para obtener la inhibición, son los indicados en la siguiente Tabla II.

TABLA II

<u>Organismo</u>	<u>Lectura 12 horas</u>	<u>Lectura 24 horas</u>
<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	64	128
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	128	>128
<u>Escherichia coli</u> EC14	8	8
<u>Klebsiella aerobacter</u> sp KA14	8	16
<u>Proteus</u> sp. PR6	NR ^x	8
<u>Proteus</u> sp. PR17	2	8
<u>Salmonella typhosa</u> SA12	NR ^x	4
<u>Salmonella typhimurium</u> S4	NR ^x	4
<u>Pasteurella multocida</u> P3	NR ^x	2
<u>Shigella sonnia</u> I SH10	NR ^x	16

25 ^x NR - No realizada.

30 El antibiótico A16884 y sus sales también presentan actividad in vivo contra algunos de los organismos anteriores y por lo tanto son útiles en el control de las infecciones causadas por dichos organismos en los huéspedes animales. El antibiótico A16884 en forma de sal monosódica por



-5 30

1 cialmente purificada presenta una DE_{50} de 23 mg/kg en ratones infectados con Proteus PR6 y una DE_{50} de 33,8 mg/kg en ratones infectados con Shigella SH3; el A16884 en forma de sal monoamónica más purificada presenta una DE_{50} de 3,64
5 mg/kg en ratones infectados con Escherichia coli EC14, una DE_{50} de 23 mg/kg en ratones infectados con Salmonella typhosa SA12 y una DE_{50} de 93,4 mg/kg en ratones infectados con Klebsiella pneumoniae Kl. La administración se realiza por vía subcutánea.

10 Como se ha observado anteriormente, el antibiótico A16884 y sus sales presentan actividad antihelmíntica además de su actividad antibacteriana. Por ello, el antibiótico A16884 o una sal del mismo puede ser administrado a los animales de sangre caliente para controlar diversos parásitos
15 internos, especialmente los gusanos estomacales e intestinales como Ascaris lumbricoides var. suum, Nematospiroides dubius, Aspiculuris tetraptera, Syphacia obvelata y similares. La administración se realiza preferiblemente por vía oral, por ejemplo incluyendo el antibiótico A16884
20 o una sal del mismo en la alimentación animal o por administración de tabletas, purgas, etc. que contengan A16884 o una sal del mismo o por otros medios. En general, unas dosis comprendidas entre 1 y 500 miligramos por kilogramo o más de peso corporal del animal son efectivas en una administración en dosis única. Cuando el antibiótico A16884 o
25 una sal del mismo se suministra como constituyente de un alimento regular, se obtienen buenos resultados con unas concentraciones comprendidas entre 0,0001 y 0,05 % o más. Un intervalo preferido de concentraciones del antibiótico
30 A16884 o de una sal del mismo en los alimentos es el com-

382489



1 prendido entre 0,01 y 0,05 %.

La actividad antihelmintica del antibiotico A16884 es ilustrada mediante las siguientes evaluaciones.

5 En una primera evaluacion, se administra sal monoamónica de antibiotico A16884 en una sola dosis, por cebadura, a dos ratones infectados con Aspicularis tetraptera y Syphacia obvelata (lombrices). La dosis es de 500 miligramos de sal monoamónica de antibiotico A16884 por kilogramo de peso corporal de cada animal individual, administrada en una suspension salina fisiologica conteniendo

10 0,125 % de metilcelulosa como agente de suspension. En la evaluacion se emplea un grupo de control de ratones infectados con Aspicularis tetraptera y Syphacia obvelata. Ambos grupos son mantenidos en condiciones normales de laboratorio durante 48 horas, despues de la administracion de la dosis al grupo tratado. A continuacion todos los ratones son sacrificados y examinados para determinar la presencia y el numero de lombrices, con los resultados contenidos en la siguiente tabla:

20

TABLA III

	<u>Número de lombrices por animal</u>	
	<u>Aspicularis tetraptera</u>	<u>Syphacia obvelata</u>
Control	26	52
25 Sal monoamónica de antibiotico A16884 a 500 mg/kg	0	2,5

En otra evaluacion, la sal monoamónica de antibiotico A16884 se mezcla con el alimento normal de los ratones para obtener una pluralidad de alimentos tratados, conteniendo sal monoamónica del antibiotico A16884 a las concentraciones de 0,005, 0,01 y 0,05 % en peso. Los alimentos

30

382489



-5

1 son utilizados como dietas para distintos grupos de ratones, a razón de 5 ratones por grupo. Alrededor de 24 horas después de la iniciación de la alimentación, los ratones son infectados con huevos de Ascaris lumbricoides var. suum.

5 Otro grupo de 5 ratones recibe el alimento no medicamentado para actuar como control pero es infectado análogamente al mismo tiempo con Ascaris lumbricoides var. suum. Todos los grupos reciben sus respectivos alimentos y se mantienen en las condiciones normales de laboratorio durante un periodo de 10 días, en cuyo momento se retira el alimento a todos los ratones. Al undécimo día, todos los ratones son sacrificados, examinándose sus pulmones para determinar la presencia y, en su caso, el número de lesiones de Ascaris lumbricoides var. suum.

15 El nivel de sal monoamónica de antibiótico A16884 en la dieta y el número medio de lesiones de pulmón por animal en cada grupo se encuentran en la siguiente tabla:

TABLA IV

20	<u>Grupo</u>	Número medio de lesiones de pulmón por grupo
	Control	2,2
	Sal monoamónica de antibiótico A16884 al 0,005 %	0,5
	Sal monoamónica de antibiótico A16884 al 0,01 %	0,4
25	Sal monoamónica de antibiótico A16884 al 0,05 %	0,4

30 El antibiótico A16884 puede ser producido cultivando una variedad de un organismo recién encontrado y no descrito hasta ahora, aislada de unas muestras de suelo obtenidas en América del Sur.

382489



1 El organismo fué aislado de las muestras de suelo
citadas suspendiendo unas porciones de dichas muestras en
agua destilada estéril y depositando las suspensiones en
bandas sobre ágar nutritivo. Las placas de ágar nutritivo
5 sembradas fueron incubadas a unos 25-35°C durante varios
días. Al final del periodo de incubación, las colonias del
organismo productor de antibiótico A16884 fueron transfe-
ridas con un aro de platino estéril a unos tubos inclinados
de ágar. Los tubos inclinados de ágar fueron incubados des-
pués para proporcionar cantidades adecuadas de inoculum
10 para la producción de antibiótico A16884.

El actinomicetes utilizado de acuerdo con este in-
vento para la producción de antibiótico A16884 ha sido de-
signado como una variedad de Streptomyces lipmanii Waks-
man y Curtis.
15

El nuevo organismo capaz de producir antibiótico
A16884 ha sido colocado en depósito permanente sin restric-
ción en cuanto a la disponibilidad con la colección de
cultivos de la Northern Utilization Research and Develop-
ment Division, Agricultural Research Service, U.S. Depart-
ment of Agriculture (anteriormente Northern Regional Re-
search Laboratories), Peoria, Illinois 61604 y es asequi-
ble al público bajo la denominación cultivo nº NRRL 3584.
20

Las características del Streptomyces lipmanii NRRL
3584 se encuentran en las siguientes tablas. Se han utiliza-
do los métodos recomendados para el International Strepto-
myces Project (Shirling et al., "Methods for Characteriza-
tion of Streptomyces Species", Intern. Bull. Systematic
Bacteriol. 16: 313-340 (1966)) para la caracterización de
25 las especies Streptomyces, junto con ciertos ensayos su-
30

382489

5 1960



1 plementarios. Los nombres de los colores fueron atribuí-
 dos de acuerdo con el método ISCC-NBS descrito por Kelly
 et al. en The ISCC-NBS Method of Designating Colors and
 5 a Dictionary of Color Names (U.S. Department of Commerce
 Circ. 553, Washington, D.C. 1955). Las cifras entre parén-
 tesis se refieren a la serie de colores de Tresner y Bac-
 kus (Tresner et al., "System of Color Wheels for Strepto-
 myces Taxonomy", Appl. Microbiol. 11: 335-338 (1963)) y
 los índices de color están subrayados en la tabla. Entre
 10 corchetes se encuentran los bloques de color de Maerz
 y Paul (Maerz et al., Dictionary of Color (McGraw-Hill
 Book Co., Inc., New York, 1950). Los cultivos fueron ob-
 tenidos a 30°C durante 14 días, salvo indicación en con-
 trario.

15

20

25

30

382489



TABLA V

1	<u>Propiedad observada</u>	<u>Características del A16884</u>
5	Morfología	Los esporoforos son habitualmente entre rectos y sinuosos con ganchos ocasionales; las esporas son cortas, cilíndricas, 0,5-1,5 micras x 1,0-2,5 micras y aparecen habitualmente en cadenas de 3-10 y ocasionalmente de 10-50. El perfil de las esporas, observado en el microscopio electrónico, es liso.
	<u>Características de cultivo en:</u>	
10	ISP nº 2 (ágar levadura/extrato de malta)	Crecimiento moderado, invertido, castaño grisáceo oscuro [8H9]; micelio aéreo amarillo pálido (Y) <u>2db</u>
	ISP nº 3 (ágar harina de cebada)	Crecimiento moderado, invertido, amarillo grisáceo oscuro [13E4]; micelio aéreo moderado, blanco (W) <u>13ba</u> a amarillo pálido (Y) <u>2db.</u>
15	ISP nº 4 (ágar sales inorgánicas y almidón soluble)	Crecimiento moderado, invertido, gris parduzco [7C7]; micelio aéreo moderado, amarillo pálido (Y) <u>2db.</u>
	ISP nº 5 (ágar glicerol-asperagina)	Crecimiento abundante, invertido, castaño amarillento claro [1317]; micelio aéreo abundante, rosa amarillento grisáceo (R) <u>5dc</u>
20	Agar pasta de tomate-harina de avena	Crecimiento abundante, invertido, castaño amarillento grisáceo [15E8]; micelio aéreo abundante, gris amarillento (GY) <u>2dc</u>
	Agar de Emerson	Crecimiento moderado, invertido, castaño amarillento grisáceo oscuro [8E9]; ausencia de micelio aéreo y de esporas
25	Agar de Bennett	Crecimiento abundante, invertido, castaño amarillento medio [14E7]; micelio aéreo abundante, amarillo grisáceo (R) <u>3ec</u>
	Agar de Czapek	Crecimiento limitado, blanco; micelio aéreo limitado (W) <u>13ba</u>
30		

382489



1

+ = crecimiento y utilización

- = crecimiento nulo, sin utilización.

TABLA VI

Diagrama de utilización de carbono para el NRRL 3584

5

<u>Compuesto</u>	<u>Respuesta de crecimiento</u>
L-arabinosa	--
Sacarosa	--
D-xilosa	+
D-fructosa	--
10 Glucosa	+
Ramnosa	--
Rafinosa	--
i-inositol	--
D-manitol	--
15 Control (sin carbono)	--

10

15

20

25

30

Como ya se ha observado, el antibiótico A16884 puede ser producido mediante cultivo de NRRL 3584. El medio de cultivo empleado en la producción del antibiótico A16884 por cultivo del organismo antes identificado puede ser cualquiera de los diversos medios, ya que de los ensayos de utilización antes descritos resulta evidente que el organismo es capaz de utilizar diferentes fuentes de energía. Sin embargo, por razones de economía de producción, máximo rendimiento de antibiótico y facilidad de aislamiento del antibiótico, son preferibles ciertas fuentes nutritivas relativamente sencillas. Por ejemplo, los medios que son útiles en la producción del antibiótico incluyen una fuente asimilable de carbono como glucosa, almidón, glicerina, melazas, dextrina y similares. La fuente preferida de carbono es la glucosa. Adicionalmente, los medios uti-

382489



-5-89

1 lizables pueden ser una fuente de nitrógeno asimilable co-
mo harina de soja, sólidos de la infusión de maíz, levadu-
ra, harina de semilla de algodón, extracto de buey, pepto-
nas (carne o soja), caseína, mezclas de aminoácidos y simi-
5 lares. Las fuentes preferidas de nitrógeno son las pepto-
nas, harina de soja, mezclas de aminoácidos y similares.
Entre las sales inorgánicas nutritivas que pueden ser in-
corporadas a los medios de cultivo se encuentran las sa-
les habituales capaces de proporcionar los iones sodio, po-
10 tasio, amonio, calcio, fosfato, sulfato, cloruro, carbona-
to y similares.

Los elementos menores necesarios para el creci-
miento y desarrollo óptimos del organismo utilizado para
la producción del antibiótico A16884 también pueden ser
15 incluidos en el medio de cultivo. Estos elementos traza
normalmente aparecen como impurezas en los restantes cons-
tituyentes del medio en cantidades suficientes para respon-
der a los requisitos de crecimiento del actinomicetes em-
pleado en este invento.

20 El pH inicial del medio de cultivo puede ser va-
riado. Sin embargo, se ha encontrado conveniente que el pH
inicial del medio esté comprendido entre 6,5 y 7,2. Como
se ha observado con otros actinomicetes, el pH del medio
aumenta gradualmente a lo largo del periodo de crecimiento
25 del organismo mientras está siendo producido el antibióti-
co y puede alcanzar un nivel de 6,7 a 7,5 o más alto, de-
pendiendo el pH final, por lo menos en parte, del pH ini-
cial del medio, de los agentes reguladores presentes en
el mismo y del periodo de tiempo durante el cual se permi-
30 te crecer al organismo.



382489

1

5

10

15

20

25

30

Las condiciones de cultivo aerobio sumergido son las condiciones de elección para la producción del antibiótico A16884. Para la preparación de cantidades relativamente pequeñas, puede emplearse el cultivo en matraces sacudidos o el cultivo superficial en frascos; pero para la preparación de grandes cantidades, se prefiere el cultivo aerobio sumergido en tanques estériles. El medio contenido en el tanque estéril puede ser inoculado con una suspensión esporulada; pero debido al retraso del crecimiento experimentado cuando se utiliza una suspensión esporulada como inoculum, se prefiere la forma vegetativa del cultivo. Evitando así el retraso del crecimiento, se consigue un uso más eficiente del equipo de fermentación. Por consiguiente, es conveniente producir en primer lugar un inoculum vegetativo del organismo por inoculación de una cantidad relativamente pequeña del medio de cultivo con el organismo en forma de espora; y cuando se ha obtenido un joven inoculum vegetativo activo, transferir asépticamente el inoculum vegetativo al tanque mayor. El medio en el cual se produce el inoculum vegetativo puede ser igual o distinto del medio utilizado para la producción en gran escala del antibiótico A16884.

El organismo que produce antibiótico A16884 crece dentro de un amplio intervalo de temperaturas comprendido entre 25° y 37°C. Al parecer la producción óptima de A16884 ocurre a temperaturas de 26-30°C. En general, la producción máxima del antibiótico se produce al cabo de unas 36-72 horas después de la inoculación del medio de cultivo.

Como es costumbre en los procesos de cultivo su-



3824895

1 mergido aerobio, se hace pasar aire estéril a través del
medio de cultivo. Para un crecimiento del organismo y una
producción del antibiótico A16884 eficientes, el volumen de
aire empleado en la producción en tanques de A16884 es de
5 0,2 a 0,4 volúmenes de aire por minuto y por volumen de cul-
tivo. El volumen preferido es de 0,40 volúmenes de aire por
volumen y por volumen de medio de cultivo.

La concentración de actividad de antibiótico en el
medio de cultivo puede ser seguida fácilmente durante el pe-
riodo de fermentación mediante el análisis de muestras del
10 medio de cultivo para determinar su actividad inhibitoria
contra el crecimiento de organismos de los que se sabe que
son inhibidos por la presencia del antibiótico A16884. Se
ha encontrado que los organismos Sarcina lutea y Salmonella
15 gallinarum son útiles para este fin. El análisis de las mues-
tras puede realizarse por los conocidos métodos turbidomé-
trico o de disco-placa.

En general, la máxima producción de A16884 ocurre al
cabo de 1 a 3 días después de la inoculación del medio de
20 cultivo en los procesos de cultivo aerobio sumergido o de
cultivo en matraz sacudido.

La actividad antibiótica producida durante la fermentación de A16884 aparece en el caldo antibiótico. Por consiguiente, las técnicas de aislamiento empleadas en la producción de A16884 están proyectadas para permitir la máxima recuperación del antibiótico a partir del caldo. Así, por ejemplo, se separan el micelio y los sólidos no disueltos del caldo de fermentación por medios convencionales, como filtración o centrifugación, y el antibiótico A16884 puede ser
25 recuperado del caldo filtrado o centrifugado empleando téo-
30

-5 AG



382489

1 nicas de extracción o adsorción.

Para la recuperación de A16884 por técnicas de adsorción, pueden utilizarse varios adsorbentes y resinas cambiadoras de ión, por ejemplo, carbono, gel de sílice, alúmina
5 y resinas cambiadoras de ión. El antibiótico A16884 tal como se obtiene de la fermentación puede encontrarse en forma anfótera o salina, según las condiciones de fermentación, Independientemente de su forma, puede ser adsorbido sobre uno de los adsorbentes anteriores u otros similares, a partir de su solución en un disolvente adecuado. El antibiótico A16884 o su sal adsorbidos pueden ser eluidos después del adsorbente mediante técnicas de elución adecuadas, por ejemplo lavando con un disolvente el adsorbente sobre el cual se encuentra adsorbido el antibiótico A16884 o una sal del mismo. Cuando la elución se realiza lavando con una solución de formiato amónico o acetato sódico, por ejemplo, el proceso da lugar a la elución de antibiótico A16884 en forma de sal amónica o sódica, respectivamente. Estas sales se convierten fácilmente de nuevo en el antibiótico A16884 por procedimientos convencionales. En el procedimiento de recuperación anterior, también se puede utilizar como adsorbente la celulosa microcristalina.

Las sales de antibiótico A16884 distintas de las sales amónicas o metálicas alcalinas, se preparan preferiblemente por reacción convencional del antibiótico A16884 en forma anfótera no modificada con el ácido o base respectivo. Así, en la preparación de las sales de adición con ácidos, el antibiótico A16884 se hace reaccionar con un ácido orgánico o inorgánico. Los ácidos adecuados representativos son ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico,

382489



-5

1 ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido ben-
zoico, ácido sulfámico, ácido tartárico, ácido cítrico, áci-
do maleico, ácido succínico, ácido ascórbico y ácido gli-
cólico.

5 El antibiótico A16884 también forma sales con los
cationes por reacción del A16884 en forma anfótera sin mo-
dificar con bases y sales orgánicas o inorgánicas. Son ejem-
plos de estas sales las sales de amonio y de amonio susti-
tuido; sales de metales alcalinos, como sodio, potasio, li-
10 tio, cesio y rubidio; sales de metales alcalino-térreos co-
mo calcio, estroncio y bario; y sales con otros metales co-
mo aluminio, cobre, cinc, magnesio y plata. Con respecto a
las bases orgánicas, la identidad de la base no es crítica
aunque, en general, se prefiere una base con un pH de 3,0
15 o más en agua. Las bases orgánicas adecuadas representati-
vas son bencilamina, metilamina, dietilamina, trietilamina,
procaína, di-isopropilamina, etanolamina, ciclohexilamina,
diciclohexilamina, difenilamina, di-n-butilamina, quinolef-
na y piridilamina.

20 Las sales del antibiótico A16884 que son farmacéuti-
camente aceptables son las preferidas en general. Sin em-
bargo, todas las sales son útiles como productos intermedio
en la producción, separación y purificación del antibiótico
A16884. Con fines terapéuticos, generalmente las sales ca-
25 tiónicas o aniónicas farmacéuticamente aceptables son equi-
valentes al antibiótico A16884; sin embargo, ocasionalmente
se prefieren algunas sales particulares debido a una pro-
piedad favorable, tal como solubilidad, comunicada por la
porción formadora de sal.

30 Con objeto de ilustrar con más detalle la puesta en

382489



1 práctica del invento, se incluyen los siguientes ejemplos a título ilustrativo.

EJEMPLO 1

Producción en matraz sacudido de antibiótico A16884

5 Se produce un cultivo esporulado de Streptomyces lipmanii NRRL 3584 cultivando el organismo en un tubo inclinado de ágar nutritivo de la siguiente composición:

	Dextrina	10,00 g
	Extracto de levadura	1,00 g
10	Caseína hidrolizada ("N-Z Amino-Tipo A", Sheffield Chemical Company)	2,00 g
	Extracto de buey	1,00 g
	Agar de Meer (lavado tres veces)	20,00 g
	Agua desionizada	1 litro

15 El pH del medio se ajusta a 7,0 mediante la adición de hidróxido sódico.

El tubo inclinado de ágar se inocula con esporas de Streptomyces lipmanii NRRL 3584 y se incuba durante 6 días a 30°C. A continuación el tubo inclinado de ágar se cubre con agua destilada estéril y se rasca suavemente para separar las esporas y las células en forma de suspensión acuosa de las mismas. Se utiliza 1 ml de la suspensión resultante para inocular cada porción de 100 ml de un medio vegetativo de la siguiente composición:

25	Glucosa	15,00 g
	Harina de soja	15,00 g
	Sólidos de infusión de maíz	5,00 g
	Carbonato cálcico	2,00 g
	Cloruro sódico	5,00 g
	Agua desionizada	1 litro

30 El pH del medio vegetativo se ajusta a 6,7 mediante



382489

-5

1 la adición de hidróxido sódico.

El inoculum vegetativo se sacude durante 36 horas a 30°C en un sacudidor recíproco con un recorrido de 2 pulgadas (5 cm) a 108 rpm. El inoculum así preparado se utiliza después en la producción de A16884, de la siguiente forma.

5 Se prepara un medio de producción de la siguiente composición:

	Harina de soja	15,00 g
10	Caseína	1,00 g
	Nitrato sódico	3,00 g
	Jarabe de glucosa (glucosa al 50 %)	20,00 g
	Agua corriente	1 litro

En matraces Erlenmeyer de 500 ml se introducen unas porciones de 100 ml del medio de producción, esterilizando a 120°C durante 30 minutos. Una vez enfriados, cada uno de los matraces se inocula con un 5 % de inoculum vegetativo. La fermentación se sacude durante 72 horas a 30°C en un sacudidor rotatorio que opera a 250 rpm. Durante la fermentación, el medio es aireado con aire estéril a un caudal de 0,4 volúmenes/volumen/minuto. El aislamiento se realiza esencialmente en la forma descrita en el Ejemplo 8.

EJEMPLO 2

25 Se produce antibiótico A16884 de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1, pero utilizando un medio de producción de la siguiente composición:

	Solubles de destilería (Nadrisol)	5,00 g
	Harina de soja (Nutrisoy 200D)	5,00 g
	Harina de cacahuet	5,00 g
30	Melazas de azúcar moreno	5,00 g



382489

-5 AGO

1	Harina de avena	5,00 g
	Glicerol	10,00 g
	Agua corriente	1 litro

y utilizando en lugar de un sacudidor rotatorio un sacudidor recíproco operando a 108 recorridos por minuto.

5

EJEMPLO 3

Se produce antibiótico A16884 por el procedimiento del Ejemplo 1, pero utilizando un medio de producción de la siguiente composición:

10	Harina de avena	20,00 g
	Glicerol	10,00 g
	Agua corriente	1 litro

EJEMPLO 4

Se produce antibiótico A16884 por el procedimiento del Ejemplo 1, pero utilizando un medio de producción de la siguiente composición:

15

	Harina de semilla de algodón	20,00 g
	Glicerol	10,00 g
	Glucosa	5,00 g
20	Agua corriente	1 litro

EJEMPLO 5

Se produce antibiótico A16884 por el procedimiento del Ejemplo 1, pero utilizando un medio de producción de la siguiente composición:

25

	Glucosa	20,00 g
	Almidón soluble	10,00 g
	Peptona (Wilson 159)	30,00 g
	Caseína hidrolizada ("N-Z amina-	
	tipo A", Sheffield Chemical Co.)	4,00 g

30

	Heptahidrato de sulfato magnésico	5,00 g
--	-----------------------------------	--------



382489

-5 AGO

1	Carbonato sódico	2,00 g
	Agua corriente	1100 ml

EJEMPLO 6

5 Se produce otro cultivo esporulado de Streptomyces lipmanii NRRL 3584 cultivando el organismo en un tubo inclinado de ágar nutritivo. En este caso el cultivo inclinado tiene la siguiente composición:

10	Dextrina	10,00 g
	Harina de semilla de algodón	10,00 g
	Extracto de levadura	1,00 g
	Agar de Meer	25,00 g
	Agua desionizada	1000 ml

El pH del medio se ajusta a 7,0 mediante la adición de hidróxido sódico.

15 El tubo inclinado de ágar se inocula con esporas de Streptomyces lipmanii NRRL 3584 y se incuba durante 7 días a 30°C. Los tubos inclinados de ágar se rascan después para separar las esporas a las que se añaden 2,0 ml de suero de buey estéril. A continuación se transfieren a un tubo liófilo estéril 0,1 ml de la suspensión resultante de esporas en suero; se seca por congelación en forma de gránulos.

25 Los gránulos secados por congelación así obtenidos se utilizan para inocular un medio vegetativo de la siguiente composición:

30	Glucosa	5,00 g.
	Dextrina	10,00 g
	Bacto-triptona	5,00 g
	Extracto de levadura	5,00 g
	Heptahidrato de sulfato magnésico	2,00 g
	Agua desionizada	1 litro

382489

-5 AB



1

El pH del medio es 6,7 y no se ajusta.

EJEMPLO 7

Producción en planta piloto de antibiótico A16884

5

En un fermentador de acero inoxidable de 40 litros se introducen 24 litros de un medio de la siguiente composición:

10

Antiespumante A (agente antiespumante vendido por Dow Corning)	0,20 g
Glucosa	5,00 g
Dextrina 700	50,00 g
Sémola de soja	25,00 g
Melazas de azúcar moreno	3,00 g
Bifosfato potásico	0,25 g
Carbonato cálcico	2,50 g
Agua corriente fría hasta	25 litros

15

El pH inicial es 6,5 y no se ajusta. El medio se esteriliza durante 30 minutos a 120°C, se enfría y después se inocula con un 5 % de inoculum vegetativo producido como en el Ejemplo 6. La fermentación se realiza a 30°C durante 6 horas, se airea con aire estéril a razón de 0,35 volúmenes/volumen/minuto y se agita mediante un agitador mecánico que funciona a 420 revoluciones por minuto. El pH final es 7,5.

20

Se recupera A16884 del caldo siguiendo el procedimiento de aislamiento indicado en el Ejemplo 8.

25

EJEMPLO 8

Aislamiento de antibiótico A16884 crudo en forma de sal monoamónica

30

Aproximadamente 60 litros del caldo obtenido en el Ejemplo 7 se filtran utilizando Hyflo Super-cel (tierra de diatomeas vendida por Johns-Manville Products Corporation).

382489

-5 AGO



1 El caldo filtrado se pasa por una columna de 9,6 x 150 cm
rellena con carbón (Pittsburgh Cal. 12 x 40, vendido por
Pittsburgh Activated Carbon, Co.). La columna se lava con
5 agua hasta que el efluente es incoloro y la actividad ad-
sorbida sobre el carbón se separa haciendo pasar acetona
acuosa al 50 % a través de la columna. La fracción que con-
tiene la actividad se combina, se concentra a vacío para
separar la acetona y se aplica a una columna de 5,9 x 104 cm
10 rellena con resina IRA-68 (ciclo de formiato) (una resina
cambiadora de anión vendida por Rohm and Haas Co. y lavada
posteriormente con ácido fórmico para convertir la resina
al ciclo de formiato). La columna se lava con agua hasta
que el efluente es transparente e incoloro y la actividad se
separa lavando con solución 0,1 M de formiato amónico. Se
15 combinan las fracciones activas y se pasan por una columna
de 4,3 x 72 cm de carbón (Pittsburgh 12 x 40). La columna
se lava con seis veces su volumen de agua y la actividad se
eluye con acetonitrilo acuoso al 30 %. Se combinan las frac-
ciones activas, se concentran a vacío para separar el ace-
20 tonitrilo y se secan por congelación. El rendimiento es
de 25-30 g de sólidos.

La preparación secada por congelación se disuelve en
un mínimo de agua y se aplica a una columna de 7,2 x 60 cm
rellena con un producto de celulosa microcristalina (Avicel,
25 vendida por la FMC Corporation), suspendido en acetonitri-
lo acuoso al 70 % y se lava con acetonitrilo antes de la
adición de la muestra activa. Después de aplicada la mues-
tra, la columna se lava con una vez su volumen de acetoni-
trilo y la actividad se eluye con metanol. Se combinan las
30 fracciones activas y se concentran hasta 200 ml aproximada-

382489



1 mente y la actividad se precipita mediante la adición de
10 volúmenes de acetona. Se filtra el precipitado, se la-
va con acetona y se seca a vacío. El rendimiento es de 9-
12 g.

5 Se disuelven 20 g del material obtenido en la for-
ma antes descrita en una cantidad mínima de agua y se apli-
can a una columna de gel de sílice (7,2 x 60 cm). El gel
de sílice (Grado 950, producido por Davison Chemical) ha
sido lavado previamente con agua y después con metanol y
10 suspendido en acetonitrilo al 70 % para rellenar la colum-
na. Después de la aplicación de la muestra, la columna se
lava con una vez su volumen de acetonitrilo y la actividad
se eluye con acetonitrilo al 70 %. Se combinan las fraccio-
nes más activas, se concentran a sequedad en vacío y se
15 disuelven en metanol y la actividad se precipita con 10 vo-
lúmenes de acetona. Se filtra el precipitado, se lava con
acetona y se seca a vacío. El rendimiento es de 8 g. Las
fracciones menos activas dan 6 g adicionales.

EJEMPLO 9

20 Purificación de la sal monoamónica de A16884

Se disuelve 1 g de la preparación secada por conge-
lación, obtenida en la forma descrita en el Ejemplo 8, en
4 ml de agua y se aplica a una columna de 2 x 60 cm, rell-
na con 175 ml de gel de sílice Grado 950, en acetonitrilo
25 acuoso al 80 %. La columna se eluye con acetonitrilo/agua
(4:1). La elución va seguida de análisis y cromatografía
en papel. Como resultado de la elución, se obtiene una plu-
ralidad de fracciones. Se combinan las fracciones que con-
tienen el antibiótico A16884 en forma de sal monoamónica,
30 se concentran a sequedad, se disuelven en un pequeño volu-

382489

-5 AG



1 men de dimetilsulfóxido y después en varios mililitros de
etanol y se precipita la actividad por adición de un exce-
so de éter. El precipitado se centrifuga y se seca a va-
cío. El rendimiento de sal monoamónica de antibiótico
5 A16884 es de 91 mg.

EJEMPLO 10

Preparación de antibiótico A16884 en forma ácida

Se disuelven 200 mg de la sal monoamónica de
A16884 en 30 ml de agua y se añaden 6 ml de resina Dowex
10 50 x 12 (H⁺) (vendida por la Dow Chemical Co.). La mezcla
se agita durante 30 minutos, se filtra, se lava la resina
con agua sobre el filtro y se combinan los filtrados. El
filtrado combinado tiene un pH de 2,7. El filtrado se con-
centra a vacío hasta 1 ml aproximadamente, se añaden 4 ml
15 de metanol y el ácido se precipita mediante la adición de
40 ml de acetona. El precipitado se separa por centrifu-
gación y se seca a vacío dando 35 mg de antibiótico A16884
en forma ácida. Presenta unos valores de pK'a de 3,5, 5,2
y 10,3 cuando se valora en dimetilformamida al 66 %, a un
20 pH inicial de 4,5.

EJEMPLO 11

Preparación de sal disódica de A16884

Se disuelven 180 mg de sal monoamónica de A16884
en unos 2 ml de agua y el pH se ajusta a 10 con NaOH 1 N.
25 La solución se concentra a vacío hasta volumen reducido,
se añaden 4 ml de metanol y la sal disódica se precipita
por adición de 40 ml de acetona. La sal se separa por cen-
trifugación y se seca a vacío. Presenta unos valores de
pK'a de 3,9, 5,2 y 10,5 cuando se valora en dimetilformamida
30 da al 66 %, a un pH inicial de 10,4; y cuando se analiza

382489



5 Ago. 1970

1 por análisis de absorción atómica, da 6 % de sodio.

EJEMPLO 12

Preparación de hidrocioruro del antibiótico A16884

5 Se disuelven 200 mg de sal monoamónica de A16884
en 2 ml de agua y se ajusta a pH 2,0 con HCl 1 N. Después
la mezcla de reacción se diluye con 5,0 ml de metanol y
se añaden 50 ml de acetona para precipitar el hidrocioruro
del antibiótico A16884 deseado. Se separa por centrifugación,
se lava con acetona y se seca a vacío. El análisis indica
10 5,74 % de cloro y la valoración electrométrica en dimetil-
formamida al 66 %, a un pH inicial de 5,0, indica la pre-
sencia de grupos valorables a 3,9, 5,2 y 10,4.

EJEMPLO 13

Aislamiento de antibiótico A16884 crudo en forma de sal mo-
15 nosódica

Se filtran aproximadamente 60 litros de caldo, obte-
nidos en la forma descrita en el Ejemplo 7, utilizando
Hyflo-Super-cel. El caldo filtrado se pasa por una columna
de 9,6 x 150 cm, rellena con carbón (Pittsburgh Cal. 12 x
20 40). La columna se lava con agua hasta obtener un líquido
incolore y la actividad absorbida se separa haciendo pasar
acetona acuosa al 50 % a través de la columna. Se combinan
las fracciones que contienen la actividad, se concentran a
vacío para separar la acetona y se aplican a una columna
25 de 5,9 x 104 cm, rellena con IRA-68 (ciclo de acetato). La
columna se lava con agua hasta que el efluente es transparen-
te e incolore y la actividad se separa lavando con acetato
sódico 0,1 N. Se combinan las fracciones activas y se pasan
por una columna de 4,3 x 72 cm, rellena con carbón Pitts-
30 burgh Cal. (12 x 40). La columna se lava con seis veces su

382489

25 AGO



1 volumen de agua y la actividad se eluye con acetona acuosa
el 30 %. Se combinan las fracciones activas, se concentran
a vacío para separar la acetona y se secan por congelación.
Rendimiento, 20-30 g. El análisis indica 2,5 % de sodio.

5 El antibiótico A16884, en forma de sal monoamónica,
se analiza para evaluar el control de los organismos bac-
terianos patógenos para las plantas. En esta evaluación,
la sal monoamónica de antibiótico A16884 se formula en una
formulación acuosa para atomización, a una concentración
10 de 400 partes por un millón de partes en peso de composición
final. En la evaluación se utilizan unas plantas de tomate
de 30 días, a razón de dos plantas por maceta. Las plantas
de una de las macetas se tratan con la solución antes des-
crita, se dejan secar al aire y después se inoculan con un
15 medio que mantiene un crecimiento activo de Pseudomonas
solanacearum. Las plantas de la otra maceta se pulverizan
con una solución acuosa para atomización idéntica a la so-
lución de tratamiento antes descrita pero exenta de anti-
biótico, para ser utilizada como control. Las plantas que
20 sirven como control se inoculan posteriormente de forma
similar. Todas las plantas se mantienen durante 24 horas
en una cámara húmeda y después se sacan y se mantienen du-
rante 7 días en buenas condiciones agrícolas. Transcurrido
este periodo de 7 días, se observan todas las plantas pa-
25 ra determinar la presencia y, en su caso, el grado de in-
fección. Las plantas tratadas con sal monoamónica de an-
tibiótico A16884 están completamente exentas de síntomas
de la enfermedad causada por Pseudomonas solanacearum,
mientras que las plantas de control presentan extensos sín-
30 tomas atribuibles al Pseudomonas solanacearum.



1

REIVINDICACIONES

5

10

15

20

25

30

1. Un procedimiento para la producción de anti-
 biótico A16884 o una sal del mismo, cuya sal monosómica
 está caracterizada como una sustancia blanca y amorfa,
 que se descompone a unos 180°C, muy soluble en agua, solu-
 ble en dimetilsulfóxido, ligeramente soluble en alcoholes
 inferiores e insoluble en acetonitrilo; que es anfótera,
 conteniendo cuatro grupos valorables de $pK'a_1 = 3,9$,
 $pK'a_2 = 5,3$, $pK'a_3 = 9,2$ y $pK'a_4 = 10,5$, cuando se valora
 en dimetilformamida al 66 % a un pH inicial de 5,8; que
 tiene un peso molecular aparente de 435 aproximadamente,
 determinado a partir de los datos de la valoración; que
 tiene la siguiente composición aproximada: 44,01 % de car-
 bono, 5,73 % de hidrógeno, 10,65 % de nitrógeno, 31,27 %
 de oxígeno y 6,86 % de azufre, que tiene una rotación óp-
 tica específica, $[\alpha]_D^{25}$, +140,9° (c = 1 % en peso/volumen
 en agua); una suspensión en aceite mineral de la cual
 tiene las siguientes bandas perceptibles en su espectro
 de absorción infrarrojo a las siguientes longitudes de
 onda, expresadas en micras: 3,18 (banda ancha), 5,66, 6,26,
 6,57, 6,89, 7,15, 7,28, 7,40, 7,73, 8,00, 8,14, 8,79, 9,24,
 9,65, 9,79 y 10,4; y que da ensayos positivos con los reac-
 tivos ninhidrina, Pan Dutscher, Benedict, Molisch, yodo y
 cloruro de dansilo y ensayos negativos con los reactivos
 de Fehling, cloruro férrico, biuret y Sakaguchi; cuyo pro-
 cedimiento consiste en cultivar un organismo que es una
 variedad de Streptomyces lipmanii NRRL 3584 productora de
 antibiótico A16884, en un medio de cultivo que contiene
 fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgá-
 nicas, en condiciones aerobias sumergidas, hasta que es



1 producida una cantidad sustancial de A16884 por dicho or-
ganismo en dicho medio de cultivo.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1,
5 en el que el medio de cultivo es mantenido a una tempera-
tura comprendida aproximadamente entre 25°C y 37°C y el
crecimiento del organismo se realiza durante un periodo
de 36 a 72 horas aproximadamente.

3. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1
o 2, que comprende adicionalmente la recuperación del an-
10 tibiótico A16884 a partir de dicho medio de cultivo.

4. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solici-
ta: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICO
A16884 O UNA SAL DEL MISMO".

15 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente Memoria descriptiva, que consta de treinta y cin-
co páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

Madrid, 5 de agosto de 1970

BERNARDO UNGRIA

P.P.

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "B. Ungria", written in a cursive style.

20

25

30

A large, dark, handwritten scribble or signature that spans across the left margin of the page, partially overlapping the line numbers 25 and 30.



382609

382609

A16884

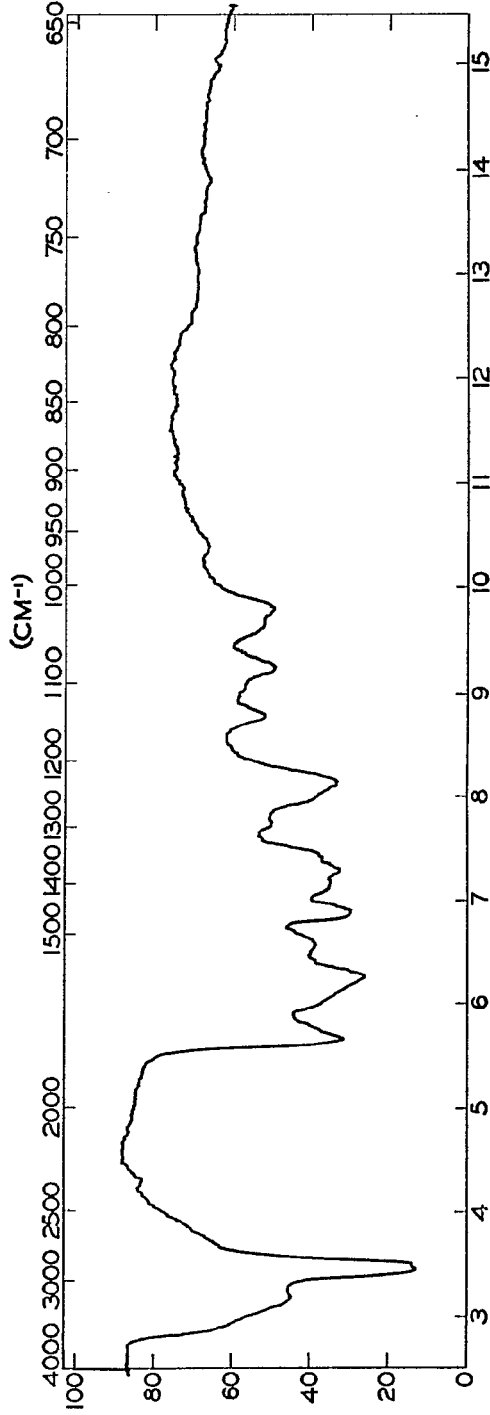


FIG. I

ESCALA VARIABLE
 MADRID, 5 DE AGOSTO DE 1970
 BERNARDO UNGRÍA
 P. P.

38-01-10

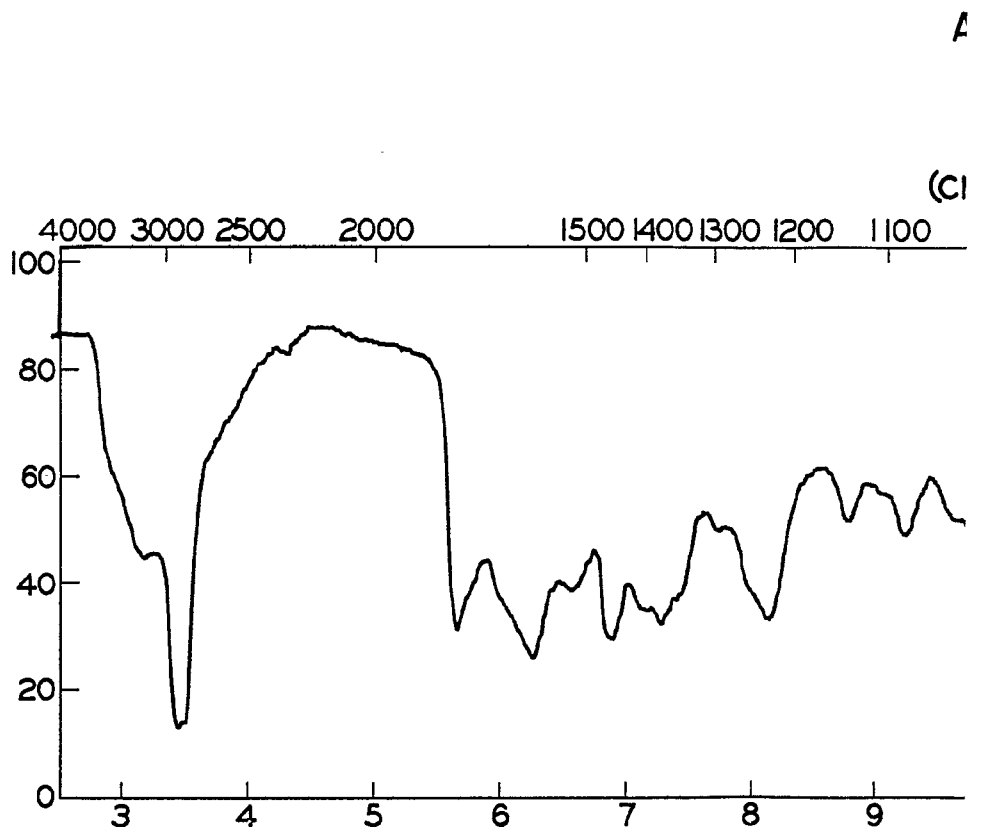
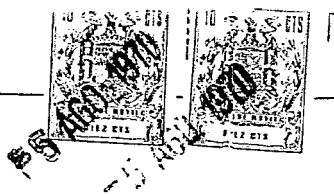


FIG. 1



HOJA UNICA

382489

A16884

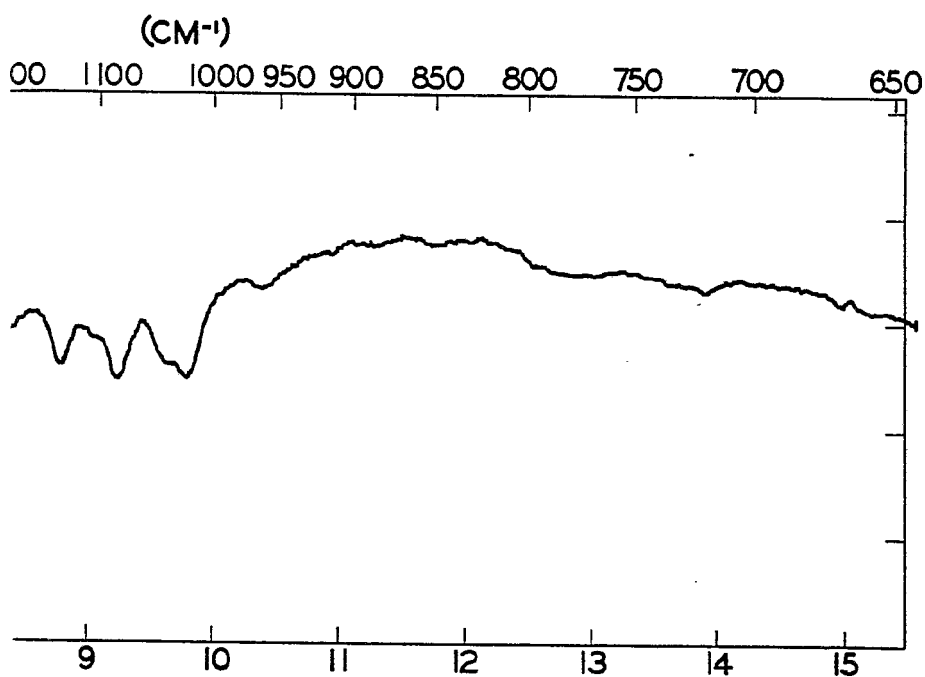


FIG. 1

ESCALA VARIABLE
MADRID, 5 DE agosto DE 19 70
BERNARDO UÑERÍA
P. P.