



24 JUN 1976

Inst. 319
A61X

MEMORIA 428.500
DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

RESIDENCIA: Ohtemachi Bldg., Ohtemachi Chiyoda-ku,

TOKYO, Japón.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL

ANTIBIOTICO FORTIMICNA A."

Prioridad: Patente japonesa No 80866/1973 del 23-7-73

AR



1

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

Esta invención se refiere a un nuevo antibiótico, Fortimicina A, y a un procedimiento para su producción. Más específicamente, esta invención se refiere a la producción de Fortimicina A por cultivo de un microorganismo perteneciente al género Micromonospora hasta que se observa actividad antibacteriana en el líquido de cultivo y después aislamiento de la Fortimicina A del mismo.

10

Siempre existe una demanda de antibióticos que presenten actividad contra un amplio espectro de bacterias. Para este fin, se ha aislado una nueva especie de microorganismo del suelo de un arrozal situado en los suburbios de la ciudad de Hiroshima, en la prefectura de Hiroshima, Japón. Esta nueva especie, cuando se cultiva, produce el nuevo antibiótico Fortimicina A, que presenta actividad antibacteriana contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Por consiguiente, el nuevo antibiótico puede ser utilizado para varios fines y es especialmente útil como desinfectante de superficies para el control de las poblaciones de Staphylococci, Escherichia y otras bacterias.

15

20

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra el espectro de absorción ultravioleta de la Fortimicina A y

25

La Figura 2 ilustra el espectro de absorción infrarrojo de la Fortimicina A.

COMPENDIO DE LA INVENCION

30

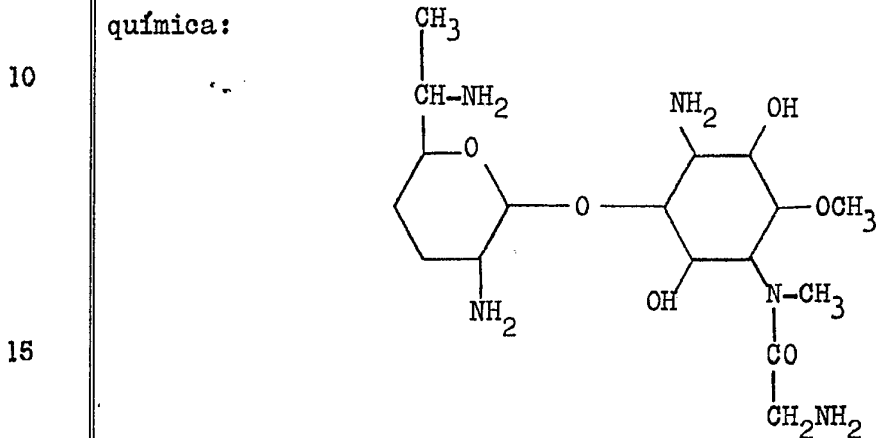
De acuerdo con esta invención, se produce un nuevo antibiótico, Fortimicina A, por fermentación de un microorganismo perteneciente al género Micromonospora, que es capaz de producir el antibiótico, en un medio nutriente hasta



1 que se detecta una actividad antibacteriana sustancial en el
líquido de cultivo. Una vez completado el cultivo, el anti-
biótico se aísla del líquido de cultivo por medios conocidos,
por ejemplo por tratamiento con una resina cambiadora de ión.

5 DESCRIPCION DE LA INVENCION

El nuevo antibiótico de este invento fué inicial-
mente identificado como XK-70-1 y ahora ha sido denominado
Fortimicina A. Se cree que presenta la siguiente estructura
química:



15 La Fortimicina A se produce por fermentación de un
microorganismo perteneciente al género Micromonospora. Un mi-
croorganismo especialmente adecuado pertenece a Micromonospora
20 olivoasterospora que se ha determinado que es una nueva espe-
cie hasta ahora no identificada. Su variedad típica fué ori-
ginalmente identificada como variedad MK-70. Esta variedad ha
sido depositada en la American Type Culture Collection, Rock-
ville, Maryland y ha recibido el número de accesión ATCC
25 21819. La variedad MK-70 presenta las siguientes propiedades:

I. Morfología:

30 La variedad MK-70 es Gram-positiva. En un medio de
ágar convencional, la variedad MK-70 nunca forma un verdadero
micelio aéreo como el que se observa con el Streptomyces, etc.
Sobre la superficie de un medio de ágar, donde hay una buena



1 formación de esporas, se observa una capa de esporas verde oliva, c^érea y lustrosa. Cuando la variedad se cultiva en un medio líquido, el caldo de cultivo presenta un ligero color de trigo en las primeras fases del cultivo, pero en las últimas

5 fases, el caldo de cultivo presenta un color verde oliva oscuro y se observa un gran número de esporas en el cultivo. Por observación microscópica de las células de la variedad MK-70 cultivada en un medio líquido, se ha encontrado que el micelio tiene alrededor de 0,5 micras de diámetro y está bien desarrollado y no-septado. Se forma una espora única en el extremo de cada esporoforo (con una longitud de 0,3-1,0 micras aproximadamente), ramificada del micelio substrato y las esporas se forman a lo largo de los micelios substrato relativamente largos. Las esporas maduras son esféricas y tienen un

10 diámetro de 1,0 micras aproximadamente. Al observar las superficies de las esporas mediante un microscopio electrónico, las esporas tienen el aspecto de una estrella ya que hay un gran número de proyecciones cuyas puntas extremas son algo redondas.

20 II. Características de cultivo:

El grado de crecimiento, el estado de la superficie de la colonia y la producción de pigmentos solubles observados cuando la variedad MK-70 se cultiva en diversos medios, están indicados en la Tabla I. Las indicaciones de color se dan de acuerdo con las clasificaciones del Color Harmony Manual (Container Corporation of America). En lo que respecta al medio de tirosina, se utiliza el medio descrito en Gordon and Smith: J.Bact. 69, 147 (1955).



24 JUN 1976

1

TABLA I

	<u>Medio</u>	<u>Crecimiento</u>	<u>Color</u>	<u>Pigmento soluble</u>
	Agar de Czapek	Moderado, plano	Oliva polvoriento (1 lg)	Ninguno
5	Agar glucosa-asparagina	Moderado, plano, céreo	Oliva (1 pl)	Ninguno
	Agar nutriente	Bueno, levantado, rebordeado	Oliva (1 pl)	Ninguno
	Agar albúmina de huevo	Moderado, plano, céreo	Oliva parduzco pálido (1 li)	Ninguno
10	Agar almidón	Bueno, plano	Teca olivane gro (1 po)	Ninguno
	Agar extracto de malta-extracto de levadura	Bueno, levantado, acanalado	Oliva oscuro (1 pn)	Oliva oscuro (1 1/2 pn)
	Agar harina de avena	Bueno, plegado, céreo	Manteca amarina (3 lc) Castaño oscuro (2 pn)	Oliva polvoriento (1 pg)
15	Agar dextrosa (1%) -NZ amina (3 %)	Moderado, céreo, plano	Trigo pálido (2 ea)	Ninguno
	Agar de Bennet	Bueno, levantado, acanalado	Oliva oscuro (1 pn)	Ninguno
	Agar Emerson	Moderado, levantado, acanalado, céreo	Oliva (1 ni)	Ninguno
20	Agar glucosa-extracto de levadura	Bueno, elevado, acanalado, céreo	Oliva oscuro (1 pn)	Ninguno
	Agar peptonahierro	Moderado, plano, céreo	Oliva oscuro (1 nl)	Ninguno
25	Agar tirosina	Moderado, plano, céreo	Oliva (1 ni)	Ninguno

III. Propiedades fisiológicas:

Las propiedades fisiológicas de la variedad MK-70 se encuentran en la Tabla II. En los ensayos, a excepción de aquellos sobre la temperatura óptima y las acciones sobre la leche y la celulosa, la variedad es cultivada a 27°C durante

30



1 dos semanas. La temperatura óptima se determina al cabo de 5 días de cultivo y las acciones sobre la leche y la celulosa se observan después de un mes de cultivo.

TABLA II

5 (1) Utilización de fuentes de carbono:

	<u>Fuentes de carbono</u>	<u>Utilización</u>
	D-arabinosa	-
	D-galactosa	-
	D-glucosa	++
10	Glicerol	-
	D-lactosa	-
	D-fructosa	-
	I-inositol	-
	D-manitol	-
15	D-rafinosa	-
	L-ramnosa	-
	Sacarosa	++
	Almidón	++
	D-xilosa	-
20	(2) Licuefacción de la gelatina	Ligeramente positiva
	(3) Acción sobre la leche	Peptonizada
	(4) Descomposición de la celulosa	Ligeramente positiva
	(5) Hidrólisis del almidón	Positiva
	(6) pH óptimo para el crecimiento	6,8 - 7,5
25	(7) Temperatura óptima para el crecimiento	30 - 38°C
	(8) Reducción de nitratos	Positiva
	(9) Formación de tirosinasa	Negativa
30	(10) Formación de pigmentos melanoides	Negativa



1 La variedad MK-70 es un mesófilo, que nunca forma
un verdadero micelio aéreo cuando se cultiva en un medio de
ágar, pero forma esporas únicas sobre el micelio substrato
y se ha encontrado por análisis que la pared celular de es-
5 ta variedad contiene ácido meso-diaminopimélico. Por consi-
guiente, la variedad MK-70 se considera como una variedad del
género Micromonospora.

10 No se han establecido bases convincentes para la
clasificación sistemática de las especies del género Micro-
monospora. Por lo tanto, la clasificación de los microorga-
nismos de este género se ha realizado hasta ahora mediante
una comparación global de propiedades morfológicas y fisioló-
gicas, etc. Se han registrado tres variedades pertenecientes
al género Micromonospora, a saber: Micromonospora echinospora
15 subsp. echinospora NRRL-2985 (ATCC 15837), Micromonospora
echinospora subsp. pallida NRRL-2996 (ATCC 15838) y Micromo-
nospora echinospora subsp. Ferruginea NRRL-2995 (ATCC 15836)
que presenta espinas romas sobre la superficie de la espora.
Sin embargo, estas tres variedades de M. echinospora forman
20 esporas de color entre pardo oscuro y negro cuando se culti-
van en un medio de ágar convencional y nunca presentan un co-
lor oliva como la variedad MK-70. Las tres variedades de
M. echinospora pueden utilizar L-ramnosa, pero la variedad
MK-70 no puede. Además, las tres variedades pueden producir
25 dos sustancias activas, una de las cuales tiene actividad so-
lamente contra las bacterias Gram-positivas y un valor Rf de
0,4 a 0,5 en cromatografía de papel utilizando como desarro-
llador n-butanol saturado de agua y el antibiótico Gentamicina
con un valor Rf de 0,60. Por otra parte, la variedad MK-70
30 puede producir cuatro sustancias activas distintas, a saber:



1 una sustancia con actividad solamente contra las bacterias
Gram-positivas y con un valor Rf de 0,05 a 0,1 en cromatogra-
fía de papel utilizando el desarrollador antes mencionado;
5 una sustancia con actividad solamente contra las bacterias
Gram-positivas y con un valor Rf de 0,00; la Fortimicina B,
con actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas
y con un valor Rf de 0,00 y la Fortimicina A que también es
activa contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas
además de presentar un valor Rf de 0,00. Como resulta evidente
10 de lo anterior, la variedad MK-70 es diferente de las tres
variedades de M. echinospora.

La variedad MK-70 presenta un color entre oliva y
oliva oscuro cuando se cultiva utilizando un medio adecuado
para la formación de esporas y produce un pigmento soluble
15 de color oliva en algunos medios. Entre las variedades del gé-
nero Micromonospora, hay algunas capaces de formar esporas
de color oliva, a saber: Micromonospora chalcea, Micromonospo-
ra fusca, etc, pero estas se distinguen por el estado super-
ficial de las esporas, por el color de los pigmentos solu-
20 bles, etc.

Otra especie de Micromonospora, es decir la Micro-
monospora coerulea habitualmente presenta un color azul ver-
doso y produce pigmentos solubles verde azulados. Los pigmen-
tos funcionan como indicador ácido-base y, por lo tanto, son
25 diferentes del pigmento de la variedad MK-70. Además, las es-
poras de M. coerulea son capaces de dispersarse en un estado
de racimo y las superficies de las esporas son lisas. Así,
la M. coerulea se distingue de la variedad MK-70.

30 Como ya se ha dicho, no hay ninguna variedad que
corresponda a la MK-70 entre las variedades del género



1 Micromonospora hasta ahora registradas. Por lo tanto, la MK-
70 se considera una nueva variedad perteneciente al género
5 Micromonospora y ha sido denominada Micromonospora olivoaste-
rospora. El nombre de esta especie procede de la formación de
6 esporas esféricas de color oliva con proyecciones. Como ya se
ha dicho, la variedad MK-70 ha sido depositada en la American
Type Culture Collection como Micromonospora sp. MK-70. La va-
riedad MK-70 también ha sido depositada en el Fermentation
10 Research Institute, Tokio, Japón, y ha recibido el número de
registro FERMP-nº 1560.

También se han aislado dos variantes de la Micromo-
nospora olivoasterospora que son capaces de producir Fortimi-
cina A. Estas variantes difieren de la variedad tipo y tienen
la capacidad de utilizar D-galactosa, D-fructosa y D-xilosa.
15 Una variante presenta además un ligero color trigo cuando se
cultiva en diversos medios ya que carece de la capacidad de
formar esporas sobre el micelio. En otros aspectos, las varian-
tes se parecen mucho a la variedad tipo. Estas dos variantes
también han sido depositadas en la American Type Culture Co-
20 llection y han recibido los números de accesión ATCC 31009 y
ATCC 31010. Estas variantes, así como la variedad tipo están
libremente a disposición del público.

Como en el caso de otras variedades de Actinomycetes,
25 los microorganismos útiles para poner en práctica esta inven-
ción pueden experimentar una mutación por medios artificiales
tales como irradiación ultravioleta, irradiación con Co⁶⁰,
irradiación con rayos X y diversos productos químicos induc-
tores de mutaciones. Por consiguiente, cualquier variedad, in-
cluso aunque haya sido mutada, es apropiada para esta invención
30 siempre que tenga la capacidad de producir Fortimicina A.



1 En general, en el procedimiento de esta invención
pueden emplearse los métodos convencionales de cultivo de
microorganismos del género Actinomycetes. Así, pueden emplear
se varias fuentes nutrientes para el medio de cultivo. Las
5 fuentes de carbono apropiadas son glucosa, almidón, manosa,
fructosa, sacarosa, melazas, etc, solos o en combinación.
Además, pueden utilizarse hidrocarburos, alcoholes, ácidos
orgánicos, etc, según la capacidad de utilización poseída por
el microorganismo particular. Pueden utilizarse solas o en
10 combinación fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, como
cloruro amónico, sulfato amónico, urea, nitrato amónico, ni-
trato sódico, etc y fuentes de nitrógeno naturales como pep-
tona, extracto de carne, extracto de levadura, levadura se-
ca, licor de infusión de maíz, harina de soja, casaminoácido,
15 proteínas vegetales solubles, etc. Además, pueden añadirse al
medio, si es necesario, sales inorgánicas como cloruro sódico,
cloruro potásico, carbonato cálcico, fosfatos de potasio,
etc. También pueden añadirse adecuadamente al medio materias
orgánicas o inorgánicas capaces de promover el crecimiento
20 del microorganismo y la producción de Fortimicina A. En ge-
neral, hemos encontrado que cuando la producción de Fortimi-
cina A se aumenta mediante la alteración de los constituyen-
tes del medio de cultivo, disminuye la producción simultánea
de otras sustancias activas.

25 Para este procedimiento el más adecuado es un méto-
do de cultivo líquido, especialmente un método de cultivo
agitado y sumergido. Es conveniente efectuar el cultivo a una
temperatura de 25 a 40°C y a un pH aproximadamente neutro.
El antibiótico de esta invención se forma y acumula en el lí-
30 quido de cultivo habitualmente al cabo de 4 a 15 días de cul-



1 tivo. Cuando el rendimiento de Fortimicina A en el líquido de
cultivo alcanza un máximo, se interrumpe el cultivo y el anti-
biótico se aísla y purifica del líquido de cultivo obtenido
después de haber separado las células microbianas, por ejem-
5 plo por filtración.

 El aislamiento y la purificación de la Fortimicina
A a partir del filtrado se realiza por los métodos habitual-
mente empleados en el aislamiento y purificación de produc-
tos metabólicos microbianos de los líquidos de cultivo.

10 Como la Fortimicina A es básica y es soluble en
agua pero escasamente soluble en los disolventes orgánicos
habituales, el antibiótico puede ser purificado por los méto-
dos normalmente empleados para la purificación de los llama-
dos antibióticos básicos solubles en agua. Más específicamen-
15 te, la Fortimicina A puede ser purificada mediante una combi-
nación apropiada de adsorción y desorción en resinas cambia-
doras de catión; cromatografía en columna empleando celulo-
sa; Sephadex LH-20 (nombre comercial, producido por Pharmacia
Fine Chemicals Inc., U.S.A.); cromatografía en gel de sílice
20 y métodos similares.

 Por ejemplo, el filtrado del cultivo exento de cé-
lulas se ajusta primero a un pH de 7,5 y después se somete a
adsorción en una resina cambiadora de catión como Amberlite
(nombre comercial, producido por Rohm and Haas Co., U.S.A.)
25 IRC-50 (forma NH_4^+). Después de lavar con agua, se realiza
la elución con amoníaco acuoso 1N. La fracción activa se con-
centra a presión reducida y después se pasa por una columna
de resina cambiadora de anión, como Dowex (nombre comercial,
producido por Dow Chemical Co., U.S.A.) 1x2 (forma OH^-). Las
30 sustancias adsorbidas se eluyen con agua y las fracciones ac-



1 tivas eluidas se recogen y concentran a presión reducida, con
lo que se obtiene un polvo crudo que contiene Fortimicina A
y otros componentes activos. Después el polvo crudo se disuel-
ve en agua. El pH de la solución acuosa se ajusta a 5,0 con
5 ácido sulfúrico 2N y después se pasa por una columna de car-
bón activo. Las sustancias activas se adsorben así sobre el
carbón. Después de lavar la columna con agua para separar las
impurezas, se realiza la elución con ácido sulfúrico 0,2N.
Las fracciones activas eluidas se recogen y pasan por una co-
10 columna de una resina cambiadora de anión como Dowex 44 (forma
OH⁻) para su neutralización. Después el efluente se liofiliza
para obtener un polvo crudo que contiene Fortimicina A en for-
ma de base libre.

15 Como método para aislar la Fortimicina A del polvo
crudo se utiliza, por ejemplo, la cromatografía en gel de sí-
lice. Como desarrollador, se emplea la capa inferior de una
mezcla de cloroformo, isopropanol y amoníaco acuoso (2:1:1).
Más específicamente, el polvo crudo se disuelve en el disol-
vente desarrollador, se introduce en una columna de gel de
20 sílice y se desarrolla con el mismo disolvente. La primera
fracción activa contiene Fortimicina B. Otros componentes tra-
za son eluidos en las fracciones sucesivas y después la For-
timicina A se eluye en fracciones que cubren un amplio inter-
valo. Las fracciones que contienen Fortimicina A se recogen
25 y concentran a presión reducida. Después de liofilizar el con-
centrado, se obtiene un polvo blanco que comprende la base del
antibiótico. El preparado así obtenido de Fortimicina A tiene
una pureza relativamente alta. Sin embargo, el preparado está
algunas veces contaminado con impurezas y, en tal caso, se so-
30 mete a cromatografía en columna de celulosa con una mezcla di-



1 solvente de n-butanol, piridina, ácido acético y agua (6:4:2:4)
como desarrollador. Las fracciones activas obtenidas así se
recogen y concentran a presión reducida, con lo que se obtie-
ne un preparado puro de Fortimicina A. Cuando la impureza es
5 una sustancia positiva en el ensayo ninhidrina, la separación
de la misma puede efectuarse por cromatografía en columna de
carboximetilcelulosa. Más específicamente, se pasa una solu-
ción del polvo crudo de Fortimicina A a través de una columna
rellena con carboximetilcelulosa (forma amónica). Las sustan-
10 cias activas son adsorbidas sobre la carboximetilcelulosa.
Después de lavar bien la columna con agua para separar la ma-
yoría de los pigmentos y de las sales inorgánicas, se realiza
la elución con bicarbonato amónico 0,2N. Las fracciones acti-
vas así purificadas de Fortimicina A se recogen y liofilizan.

15 En los procedimientos de purificación citados, las
fracciones activas de Fortimicina A se determinan mediante
cromatografía de papel ascendente utilizando papel de filtro
Whatman nº 1. El desarrollo se realiza a la temperatura ambien-
te durante 10 a 15 horas, utilizando la capa inferior de una
20 mezcla disolvente de cloroformo, metanol y amoniaco acuoso al
17 % (2:1:1). El valor R_f de la Fortimicina A en el cromato-
grama de papel es alrededor de 0,37.

25 La Fortimicina A es un polvo blanco básico. Los valo-
res del análisis elemental encontrados son: C, 50,2 %; H, 8,67 %;
N, 17,5 % y O, 23,6 %. El peso molecular es 405 (calculado ba-
sándose en los resultados obtenidos por espectrometría de ma-
sas de alta resolución). Por consiguiente, se considera que la
fórmula molecular es C₁₇H₃₅N₅O₆. Los valores del análisis ele-
20 mental calculados son: C, 50,4 %; H, 8,64 %; N, 17,3 % y O,
23,7 %. El punto de fusión es superior a 200°C (con descompo-



1 sición).

La Figura 1 ilustra el espectro de absorción ultravioleta de una solución acuosa de Fortimicina A. El espectro no revela ningún máximo de absorción característico entre 220 y 360 mμ y muestra simplemente una absorción terminal.

La rotación óptica de la base libre de Fortimicina A es $[\alpha]_D^{25} = +26^\circ$ (c = 0,2, H₂O).

La Figura 2 ilustra el espectro de absorción infrarrojo de la Fortimicina A. Como resulta evidente en la figura, la Fortimicina A presenta picos a las siguientes longitudes de onda (cm⁻¹):

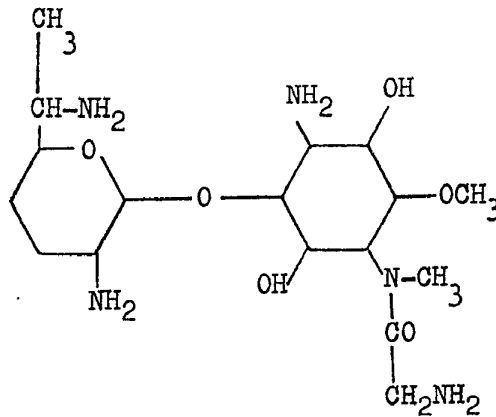
3400, 2900, 1625, 1570, 1480, 1390, 1340, 1100, 1030.

La base libre de Fortimicina A es muy soluble en agua, también es soluble en metanol y ligeramente soluble en etanol y acetona pero es insoluble en disolventes orgánicos como cloroformo, benceno, acetato de etilo, acetato de butilo, éter etílico, butanol, éter de petróleo, n-hexano, etc.

La Fortimicina A da reacciones positivas en el ensayo con ninhidrina y en el ensayo con permanganato potásico y reacciones negativas en el ensayo de Elson-Morgan y en el ensayo con biuret.

Basándose en los estudios realizados sobre el antibiótico, actualmente se cree que la Fortimicina A presenta la siguiente estructura química:

30



10 Sin embargo, debe entenderse que la estructura química anterior no está confirmada y la naturaleza e identificación de la Fortimicina A debe realizarse de acuerdo con los procedimientos anteriores.

15 Los valores Rf de la Fortimicina A obtenidos como resultado de la cromatografía de papel y de la cromatografía en capa fina empleando diversos desarrolladores se encuentran en las siguientes Tablas III, IV y V. Estos valores se comparan con los valores Rf de diversos antibióticos similares desarrollados de la misma manera.

TABLA III

20 Valores Rf de la Fortimicina A en cromatografía de papel ascendente (a 28°C)

<u>Desarrollador</u>	<u>Valor Rf</u>	<u>Periodo de desarrollo (horas)</u>
Cloruro amónico al 20 %	0,96	3
n-butanol saturado de agua	0,00	15
25 n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1)	0,06	15
Acetato de etilo saturado de agua	0,00	4
n-butanol saturado de agua conteniendo 2 % (peso/volumen) de ácido p-toluensulfónico y 2 % (volumen/volumen) de piperidina	0,04	15



1

TABLA IV

Valores Rf de la Fortimicina A, Gentamicina C compleja y Gentamicina C₂ en cromatografía en capa fina sobre gel de sílice (desarrollado a la temperatura ambiente durante 3 horas)

5

<u>Desarrollador*</u>	<u>Antibiótico</u>	<u>Valor Rf</u>
I	Fortimicina A	0,74
I	Gentamicina C compleja	0,71
I	Gentamicina C ₂	0,71
II	Fortimicina A	0,37
II	Gentamicina C compleja	0,06-0,16
II	Gentamicina C ₂	0,08-0,14

10

* Desarrollador I: la capa superior de la mezcla de cloroformo, metanol y amoníaco acuoso al 17 % (2:1:1 en volumen)

15

Desarrollador II: Acetato amónico al 10 % y metanol (1:1 en volumen).

TABLA V

Valores Rf de antibióticos conocidos en cromatografía de papel ascendente utilizando como desarrollador la capa inferior de una mezcla de cloroformo, metanol y amoníaco acuoso al 17 % (2:1:1) (desarrollada a la temperatura ambiente durante 12 horas)

20

25

30

<u>Antibiótico</u>	<u>Valor Rf</u>
Estreptomomicina A	0,02
Estreptomomicina B	0,00
Bluensomicina	0,01
Ribostamicina	0,00
Lividomicina A	0,00
Lividomicina B	0,03
Lividomicina D	0,02
Espectinomomicina	0,45



TABLA V (continuación)

	<u>Antibiótico</u>	<u>Valor Rf</u>
1	Kasugamicina	0,01
	Butirosina A	0,00
5	Butirosina B	0,01
	Higromicina B	0,02
	Gentamicina A	0,00
	Gentamicina B	0,00
	Gentamicina C _{1a}	0,18
10	Gentamicina C ₁	0,59
	Gentamicina C ₂	0,38
	Sisomicina	0,18
	Neomicina A	0,00
	Neomicina B	0,03
15	Antibiótico n° 460	0,01
	Neomicina C	0,00
	Kanamicina A	0,02
	Kanamicina B	0,01
	Kanamicina C	0,02
20	Paramomicina	0,00
	Nebramicina compleja	0,01
	Tobramicina	0,02
	Apramicina	0,02
	Nebramicina factor 4	0,01
25	Nebramicina factor 5	0,00
	Miomicina	0,00
	XK-62-2*	0,49
	XK-70-A** (Fortimicina B)	0,65
30	XK-70-1 (Fortimicina A)	0,37



1 * Un nuevo antibiótico descrito en la solicitud de patente estadounidense número de serie 364.058, presentada el 25 de Mayo de 1973.

5 ** Un nuevo antibiótico descrito en la solicitud de patente estadounidense número de serie 458.422, presentada el 5 de Abril de 1974.

10 Los espectros antibacterianos de la Fortimicina A frente a diversos microorganismos por el método de dilución en agar (pH 8,0) se encuentran en la siguiente Tabla VI.

TABLA VI

	<u>Microorganismo ensayado</u>	<u>Concentración mínima de inhibición (Y/ml)</u>
	<u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 10541	10
15	<u>Bacillus subtilis</u> nº 10707	0,02
	<u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	0,6
	<u>Bacillus cereus</u> var. <u>mycoides</u> ATCC 9463	0,6
	<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	0,04
20	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8942 (resistente a la Kanamicina, Paromomicina, Streptomocina, Gentamicina y Nebramicina)	10
	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8950 (resistente a la Streptomocina, Tetraciclina, Penicilina y Sulfonamida)	1,3
	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8953 (resistente a la Streptomocina, Kanamicina, Paromomicina, Tetraciclina, Neomicina, Kanamicina B y Eritromicina)	1,3
25	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8956 (resistente a la Streptomocina, Paromomicina, Tetraciclina, Eritromicina y Oleandomicina)	0,32
	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8957 (resistente al Cloranfenicol, Streptomocina, Kanamicina B, Tetraciclina y Paromomicina)	0,32
30	<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	0,08



TABLA VI (continuación)

	<u>Microorganismo ensayado</u>	<u>Concentración mínima de inhibición (γ/ml)</u>
1	<u>Escherichia coli</u> ATCC 26	0,16
5	<u>Escherichia coli</u> KY 8302 (resistente al Cloranfenicol, Streptomina, Kanamicina, Paromomicina, Tetraciclina y Espectinomomicina)	0,26
	<u>Escherichia coli</u> KY 8310 (resistente al Cloranfenicol, Streptomina, Kanamicina, Gentamicina, Kanamicina B, Paromomicina, Tetraciclina y Espectinomomicina)	0,13
10	<u>Escherichia coli</u> KY 8314 (resistente a la Streptomina)	0,26
	<u>Escherichia coli</u> KY 8315 (resistente a la Streptomina, Kanamicina, Paromomicina y Neomicina)	0,13
15	<u>Escherichia coli</u> KY 8327 (resistente a la Kanamicina, Gentamicina, Sisomicina y Tobramicina)	0,13
	<u>Escherichia coli</u> KY 8331 (resistente a la Kanamicina, Ribostamicina, Neomicina, Paromomicina y Iividomicina)	0,3
	<u>Escherichia coli</u> KY 8332 (resistente a la Kanamicina y a la Tobramicina)	0,3
20	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH n° 1	5
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8510 (resistente a la Kanamicina, Kanamicina B, Tobramicina, Gentamicina C _{1a} y Ribostamicina)	5
	<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	0,16
	<u>Proteus vulgaris</u> KY 4296 (resistente al ácido nalidixico)	0,41
25	<u>Proteus vulgaris</u> Abbott JJ, KY 4295	0,8
	<u>Proteus mirabilis</u> Finland 9 KY 4293	0,8
	<u>Proteus mirabilis</u> n° 825 KY 4292	0,41
	<u>Proteus mirabilis</u> n° 39 KY 4290	0,8
	<u>Proteus morgani</u> Jenkins KY 4298	1,6
30	<u>Proteus rettgeri</u> Booth KY 4288	0,8



4 JUN 1977

TABLA VI (continuación)

<u>Microorganismo ensayado</u>	<u>Concentración mínima de inhibición (γ/ml)</u>
<u>Proteus rettgeri</u> Hambrook KY 4289	0,41
<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	0,3
<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 9992	0,08

Es evidente en lo que antecede que la Fortimicina A presenta una amplia gama de actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y también ejerce una intensa actividad antibacteriana contra Staphylococcus aureus y Escherichia coli que son resistentes a diversos antibióticos conocidos. Especialmente, la Fortimicina A se caracteriza por presentar una intensa actividad antibacteriana contra microorganismos de Escherichia coli y Staphylococcus aureus normalmente resistentes a la Kanamicina, Gentamicina, Tobramicina y similares y también una actividad antibacteriana satisfactoria contra las bacterias del género Proteus. Se ha encontrado que cuando se utiliza en la terapia de diversas enfermedades infecciosas causadas por las bacterias antes mencionadas, la Fortimicina A exhibe notables efectos terapéuticos. En este aspecto, se han realizado ensayos in vivo en ratones infectados intraperitonealmente con Escherichia coli Juhl KY 4286. Los ratones así infectados se trataron con diversas concentraciones de Fortimicina A por infección subcutánea. Como resultado, se ha determinado que la DE₅₀ de la Fortimicina A es de 6 mg/kg. A la vista de su excelente actividad antibacteriana, esta sustancia, Fortimicina A, se considera útil en el tratamiento médico como sustancia antibacteriana. Además, dado su amplio espectro antibacteriano, la Fortimicina A también puede ser útil como agente antibacteriana

1
5
10
15
20
25
30



1 no superficial.

5 La comparación de la Fortimicina A con otros antibió-
ticos ilustra todavía más su novedad. Como antibióticos bási-
cos solubles en agua, producidos por microorganismos del gé-
nero Micromonospora, con un amplio espectro antibacteriano,
podemos citar antibióticos tales como Gentamicina [M.J. Weins-
tein y colaboradores: Antimicrobial Agents and Chemotherapy
1963, pág. 1; D.J. Cooper y colaboradores; J.Infect. Dis.,
10 119, 342 (1969); y J.A. Waitz: Antimicrobial Agents and Chemo-
therapy 2, 464 (1972)], Antibiótico n° 460 (publicación de pa-
tente japonesa n° 17153/71), Sisomicina [M.J. Weinstein y co-
laboradores: J.Antibiotics, 23, 551, 555, 559 (1970)], XK-62-2
(solicitud de patente estadounidense número de serie 364.058,
presentada el 25 de Mayo de 1973), Fortimicina B (solicitud
15 de patente estadounidense número de serie 458.422, presentada
el 5 de Abril de 1974), etc. Sin embargo, como resulta eviden-
te en la Tabla V, los valores Rf de la Gentamicina A, B, C_{1a}
y C₁ son 0,00, 0,00, 0,18 y 0,59 y el de la Fortimicina A es
0,37. Por lo tanto, la Fortimicina A es diferente de estas
gentamicinas. Por otra parte, el valor Rf de la Gentamicina
20 C₂ es 0,38 y el de la Fortimicina A es 0,37. Estos valores
son muy próximos. Sin embargo, los valores Rf de la Gentamici-
na C₂ y de la Fortimicina A medidos en cromatografía en capa
fina de gel de sílice, utilizando el desarrollador II, son
25 respectivamente 0,08-0,14 y 0,37. Por consiguiente, la Forti-
micina A es diferente de la Gentamicina C₂. Además, cuando se
compara con el Antibiótico n° 460, la Sisomicina, el XK-62-2
y la Fortimicina B, es evidente que la Fortimicina A difiere
de estos antibióticos ya que los valores Rf del Antibiótico
30 n° 460, de la Sisomicina, del XK-62-2 y de la Fortimicina B



1 mostrados en la Tabla III son respectivamente: 0,01, 0,18,
0,49 y 0,65, mientras que el correspondiente valor Rf de la
Fortimicina A es 0,37.

5 Como antibióticos básicos, solubles en agua, produ-
cidos por microorganismos de Actinomycetes distintos de los
del género Micromonospora, que tienen un amplio espectro anti-
bacteriano, podemos citar antibióticos como la Estreptomicina,
Ribostamicina, Lividomicina, Espectinomicina, Kasugamicina,
Neomicina, Kanamicina, Nebramicina, Paromomicina, etc. La
10 Fortimicina A difiere considerablemente de estos antibióticos
en propiedades físicas y químicas. De los valores Rf en cromatografía de papel indicados en la Tabla III resulta evidente que la Fortimicina A es diferente de estos antibióticos conocidos.

15 Como la Fortimicina A contiene grupos básicos, puede existir en forma de sales de adición de ácido. Por consiguiente, esta invención considera las sales de adición no tóxicas y farmacéuticamente aceptables del antibiótico, incluidas las sales de adición de ácidos minerales como hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, sulfamato y fosfato y las sales de adición de ácidos orgánicos como maleato, acetato, citrato, oxalato, succinato, benzoato, tartrato, fumarato, malato, mandelato, ascorbato y similares.

20 La práctica de ciertas realizaciones específicas de la invención es ilustrada mediante los siguientes ejemplos representativos.

EJEMPLO 1

25 En este ejemplo, se emplea Micromonospora olivocastrospora MK-70 (ATCC 21819) (FERM-P nº 1560) como variedad de siembra. Se inoculan 4 ml de la variedad de siembra en 10 ml



1 de un medio de siembra que contiene 2 % de glucosa, 0,5 % de
peptona, 0,5 % de extracto de levadura y 0,1 % de carbonato
cálcico (pH 7,5 antes de la esterilización) en un tubo de
ensayo de 50 ml. El cultivo se realiza a 30°C durante 5 días.
5 Después se inoculan 10 ml del caldo de cultivo de siembra en
30 ml de un segundo medio de siembra contenido en un Erlenme-
yer de 250 ml. La composición del segundo medio de siembra
es la misma que la del primer medio. El segundo cultivo de
siembra se realiza a 30°C durante 2 días, con sacudidas.
10 Después se inoculan 30 ml del segundo caldo de cultivo
de siembra en 300 ml de un tercer medio de siembra contenidos
en un Erlenmeyer de 2 litros provisto de tabiques. La composi-
ción del tercer medio de siembra es la misma que la del primer
medio de siembra. El tercer cultivo de siembra se realiza a
15 30°C durante 2 días, con sacudidas y se inoculan 1,5 litros
del tercer caldo de cultivo de siembra (correspondientes al
contenido de 5 matraces) en 15 litros de un cuarto medio de
siembra contenidos en un fermentador vibratorio de vidrio de
20 30 litros. La composición del cuarto medio de siembra es la
misma que la del primer medio de siembra. El cultivo en el
fermentador vibratorio se realiza a 37°C durante 2 días, con
aireación y agitación (revoluciones: 350 rpm; aireación: 15
l/minuto). Después se inoculan 15 litros del cuarto caldo de
25 cultivo de siembra en 150 litros de un medio de fermentación
principal en un fermentador de 300 litros. El medio de fer-
mentación principal comprende 4 % de almidón soluble, 2 % de
harina de soja, 1 % de licor de infusión de maíz, 0,05 % de
K₂HPO₄, 0,05 % de MgSO₄·7H₂O, 0,03 % de KCl y 0,1 % de CaCO₃
30 (pH 7,5 antes de la esterilización). El cultivo en el fermentador se lleva a cabo a 37°C durante 4 días, con aireación y



1 agitación (revoluciones: 150 rpm; aireación: 80 l/minuto).

Una vez completado el cultivo, el caldo de fermentación resultante se ajusta a pH 2,5 con ácido sulfúrico concentrado y se agita durante 30 minutos. Después se añaden unos
5 7 kg de un auxiliar de filtración, Radiolite nº 600 (producto de Showa Kagaku Kogyo Co., Ltd., Japón) y las células microbianas se separan por filtración. El filtrado se ajusta a un pH de 7,5 con hidróxido sódico 6N y se pasa por una columna rellena con unos 20 litros de una resina cambiadora de
10 cación, Amberlite IRC-50 (forma amónica) y se desprecia el efluente. Las sustancias activas están adsorbidas en la resina. Después de lavar la resina con agua, las sustancias activas adsorbidas se eluyen con amoníaco acuoso 1N. La actividad del eluato se determina mediante un método de disco de
15 papel, utilizando una placa de ágar de Bacillus subtilis nº 10707. Se recogen las fracciones activas y la mezcla se concentra hasta un litro aproximadamente bajo presión reducida. El concentrado se pasa por una columna rellena con 500 ml de una resina cambiadora de anión, Dowex 1x2 (forma OH⁻). Después se pasan a través de la columna alrededor de 2 litros de
20 agua, con lo que las impurezas son eliminadas y las sustancias activas son eluidas. Las fracciones activas así obtenidas se recogen y concentran hasta unos 100 ml bajo presión reducida y el concentrado resultante se pasa por una columna rellena con unos 50 ml de carbón activo en polvo. Las sustancias activas son adsorbidas en el carbón en polvo. Después la columna se lava con agua y se desprecian el efluente y el agua de lavado. Después las sustancias activas adsorbidas se
25 eluyen con ácido sulfúrico 0,2N. La actividad del eluato se
30 determina por el método del disco de papel utilizando Bacillus



1 subtilis y se recogen las fracciones activas. Las fracciones
así obtenidas se pasan por una columna de Dowex 44 (forma
OH⁻) y las sustancias activas se eluyen con agua. Las frac-
ciones activas se recogen de nuevo y se concentran hasta
5 unos 50 ml. El concentrado así obtenido se liofiliza con lo
que se obtienen alrededor de 32 g de un polvo crudo que con-
tiene Fortimicina A. El polvo crudo presenta una actividad
de 575 unidades/mg (la actividad de 1 mg de un producto puro
corresponde a 1000 unidades).

10 Después se colocan 10 g del polvo crudo en forma de
capa delgada y uniforme sobre 500 ml de gel de sílice intro-
ducidos en una columna de vidrio. La columna de vidrio se
prepara suspendiendo el gel de sílice en un disolvente de la
capa inferior de una mezcla formada por cloroformo, isopropa-
15 nol y amoniaco acuoso al 17 % (2:1:1 en volumen) y después
empaquetando la suspensión apretadamente en la columna en
forma de capa uniforme y a continuación lavando con el mis-
mo disolvente. Después de colocar el polvo crudo en la par-
te superior de la columna, se realiza la elución con el di-
20 solvente antes descrito, vertiéndolo gradualmente en la co-
lumna desde su parte superior y a continuación se lleva a
cabo la elución a un caudal de unos 50 ml/hora. El eluato
se obtiene como fracciones de 20 ml cada una y la actividad
de cada fracción se determina por un método de disco de pa-
25 pel. La Fortimicina B es eluída en primer lugar. Después se
obtienen fracciones que contienen Fortimicina A. Las frac-
ciones activas se someten a cromatografía de papel y las
fracciones que contienen Fortimicina A se recogen y concen-
tran a presión reducida para separar por completo el disol-
30 vente. Después se disuelve el concentrado en una pequeña can-



1 tidad de agua. Después de liofilizar la solución, se obtienen
alrededor de 1,8 g de un preparado purificado de la base li-
bre de Fortimicina A. La actividad del preparado es alrededor
de 970 unidades/mg.

5

EJEMPLO 2

En este ejemplo se utiliza la misma variedad de siem-
bra y los mismos cultivos de siembra desde el primero al cuar-
to. Como medio principal de fermentación, se emplea un medio
con la siguiente composición:

10	Almidón soluble	4 %
	Ebios (levadura en polvo desecada, producida por Tanabe Farmaceutical Co., Japón)	3 %
	K_2HPO_4	0,05 %
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 %
15	KCl	0,03 %
	$CaCO_3$	0,1 %

15

20

25

30

El cultivo se realiza de la misma manera que en el
Ejemplo 1. El aislamiento de un polvo crudo conteniendo For-
timicina A se lleva a cabo de la misma forma que en el Ejem-
plo 1, con lo que se obtienen alrededor de 63 g de un polvo
crudo con una actividad de unas 650 unidades/mg. Se purifica
el polvo crudo por el método del Ejemplo 1, con lo que se
obtienen alrededor de 18 g de Fortimicina A purificada con
una actividad de unas 850 unidades/mg. El preparado así obte-
nido es purificado además mediante cromatografía en columna
de celulosa. Específicamente, el preparado se coloca en for-
ma de capa delgada y uniforme sobre unos 500 ml de celulosa
en polvo (Avicel, Funakoshi Yakuhin Co., Ltd.) introducidos
en una columna de vidrio. La columna se prepara suspendiendo
la celulosa en polvo en una mezcla disolvente de n-butanol,



1 ácido acético, piridina y agua (6:2:4:4). Después la suspen-
sión se rellena apretadamente en la columna de vidrio como
capa uniforme y a continuación se lava bien con el mismo di-
solvente. Después de colocar el preparado en la parte supe-
5 rior de la columna, se efectúa la elución con el mismo disol-
vente vertiéndolo gradualmente en la columna desde la parte
superior y después continuando la elución a un caudal de
1 ml/minuto aproximadamente. El eluato se obtiene como frac-
ciones de 10 ml cada una y la actividad de cada fracción se
10 determina mediante un método de disco de papel. Las fraccio-
nes activas se recogen y concentran a presión reducida para
separar completamente el disolvente. El concentrado se disuel-
ve en una pequeña cantidad de agua. Después de liofilizar la
solución, se obtienen alrededor de 9 g de un preparado puri-
15 ficado de la base de Fortimicina A. La actividad de este pre-
parado es de 980 unidades/mg.

EJEMPLO 3

En este ejemplo, se utiliza la misma variedad de siem-
bra y los mismos cultivos de siembra desde el primero al cuar-
20 to del Ejemplo 1. Como medio de fermentación principal, se
emplea un medio con la siguiente composición:

Almidón soluble	4 %
Casaminoácido (un hidrolizado ácido de caseína, producido por Difco Labs. U.S.A)	3 %
25 K_2HPO_4	0,05 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 %
KCl	0,03 %
$CaCO_3$	0,1 %

30 El cultivo, el aislamiento y la purificación de la
Fortimicina A se realizan de la misma manera que en el Ejem-



1 plo 1, obteniéndose alrededor de 18,5 g de un preparado puri-
ficado de Fortimicina A con una actividad de unas 965 unida-
des/mg.

EJEMPLO 4

5 En este ejemplo, un caldo de cultivo obtenido efectuan-
do la fermentación de la misma manera que en el Ejemplo 1, se
somete a cromatografía de papel para confirmar la presencia,
en cantidades importantes, de Fortimicina A. Después el cal-
do se trata de la misma manera que en el Ejemplo 1 para obte-
10 ner un polvo crudo que contiene Fortimicina A. A continuación
se disuelven 3 g del polvo crudo resultante en 5 ml de agua
y la solución se vierte en una columna rellena con unos 200 ml
de carboximetilcelulosa (forma amónica). A continuación, se
15 pasan a través de la columna unos 1000 ml de agua con lo que
las sustancias activas son adsorbidas sobre la carboximetil-
celulosa y la mayor parte de los pigmentos y sales inorgáni-
cas no adsorbidos son eliminados. Después se realiza la elu-
ción con una solución reguladora 0,2M de ácido cítrico-ácido
20 fosfórico (pH 3,0) a un caudal de unos 50 ml/hora y el elua-
to se recoge como fracciones de 10 ml cada una. La actividad
de cada fracción se determina por un método de disco de pa-
pel. Las fracciones activas se someten a cromatografía de pa-
pel y se recogen las fracciones que contienen Fortimicina A.
25 Las fracciones de Fortimicina A se pasan por una columna de
Amberlite CG-50 (forma H⁺) con lo que las sustancias activas
son adsorbidas sobre la resina. Después de lavar la columna
con agua, se realiza la elución con ácido clorhídrico 0,5N.
Se recogen las fracciones activas y después se pasan por una
30 columna de Dowex 44 (forma OH⁻) para su neutralización. El
efluente resultante se liofiliza con lo que se obtienen unos



1 560 mg de la base libre de Fortimicina A. La actividad del producto es alrededor de 985 unidades/mg.

EJEMPLO 5

5 En este ejemplo, se utiliza como variedad de siembra Micromonospora olivoasterospora Mm 744, KY 11067 (FERM-P, nº 2193, ATCC 31009). Del primero al cuarto cultivo de siembra se realizan de la misma forma que en el Ejemplo 1, empleando un medio de siembra que contiene 2 % de glucosa, 0,5 % de peptona, 0,3 % de extracto de levadura, 0,1 % de carbonato cálcico (pH: 7,2 antes de la esterilización). Des-

10 pués se inoculan 15 litros del cuarto caldo de cultivo de siembra en 150 litros de un medio de fermentación principal contenido en un fermentador de acero inoxidable de 300 litros. El medio de fermentación principal está constituido por 2 %

15 de almidón soluble, 0,5 % de harina de soja, 2 % de glucosa, 1 % de licor de infusión de maíz, 1 % de extracto de levadura, 0,05 % de K_2HPO_4 , 0,05 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,03 % de KCl y 0,1 % de $CaCO_3$ (pH: 7,0 antes de la esterilización). El cultivo se realiza a 30°C durante 4 días, con aireación y

20 agitación (revoluciones: 150 rpm; aireación: 80 l/minuto). Una vez completado el cultivo, se obtienen del caldo de fermentación, de la misma manera que en el Ejemplo 1, alrededor de 42 g de un polvo crudo que contiene Fortimicina A. La actividad del polvo crudo es alrededor de 560 unidades/mg. El polvo

25 crudo así obtenido se somete después a purificación como en el Ejemplo 1, con lo que se obtienen unos 6,8 g de la base libre de Fortimicina A. La actividad del producto es alrededor de 975 unidades/mg.



4 JUN 1976

EJEMPLO 6

1

En este ejemplo se utiliza como variedad de siembra el Micromonospora olivoasterospora MK 80, KY 11055 (FERM-P n^o 2192, ATCC 31010). La variedad de siembra se cultiva para sembrar en cuatro fases como en el Ejemplo 1, empleando un medio de siembra constituido por: 1 % de glucosa, 1 % de almidón soluble, 0,5 % de extracto de levadura, 0,5 % de peptona y 0,1 % de carbonato cálcico. (pH: 7,0 antes de la esterilización). El caldo de cultivo de siembra procedente del cuarto cultivo de siembra se inocular después en un medio de fermentación principal como en el Ejemplo 1. Sin embargo, en este ejemplo se usa el medio de fermentación del Ejemplo 5. A partir del caldo de fermentación principal resultante se obtienen unos 52 g de un polvo crudo que contiene Fortimicina A, siguiendo el mismo procedimiento del Ejemplo 1. La actividad del polvo crudo es alrededor de 530 unidades/mg. El polvo crudo así obtenido se somete después a purificación de la misma forma que en el Ejemplo 1, con lo que se obtienen alrededor de 9 g de la base libre de Fortimicina A. La actividad del producto es alrededor de 980 unidades/mg.

5

10

15

20

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

REIVINDICACIONES

25

1.- Un procedimiento para la producción del antibiótico Fortimicina A caracterizado por

(a) un peso molecular de 405;

(b) la fórmula molecular: $C_{17}H_{35}N_5O_6$;

(c) un espectro de absorción ultravioleta esencialmente como el mostrado en la Figura 1;

(d) un espectro de absorción infrarrojo esencial-

30



1 mente como el mostrado en la Figura 2;
y sus sales de ácido farmacéuticamente aceptables; cuyo pro-
cedimiento consiste en cultivar un microorganismo pertene-
5 ciente al género Micromonospora que tiene la capacidad de
producir Fortimicina A en un medio nutriente a una tempera-
tura comprendida entre 25 y 40º C, a pH aproximadamente neu-
tro, acumular Fortimicina A en dicho medio y recuperar dicho
antibiótico del medio.

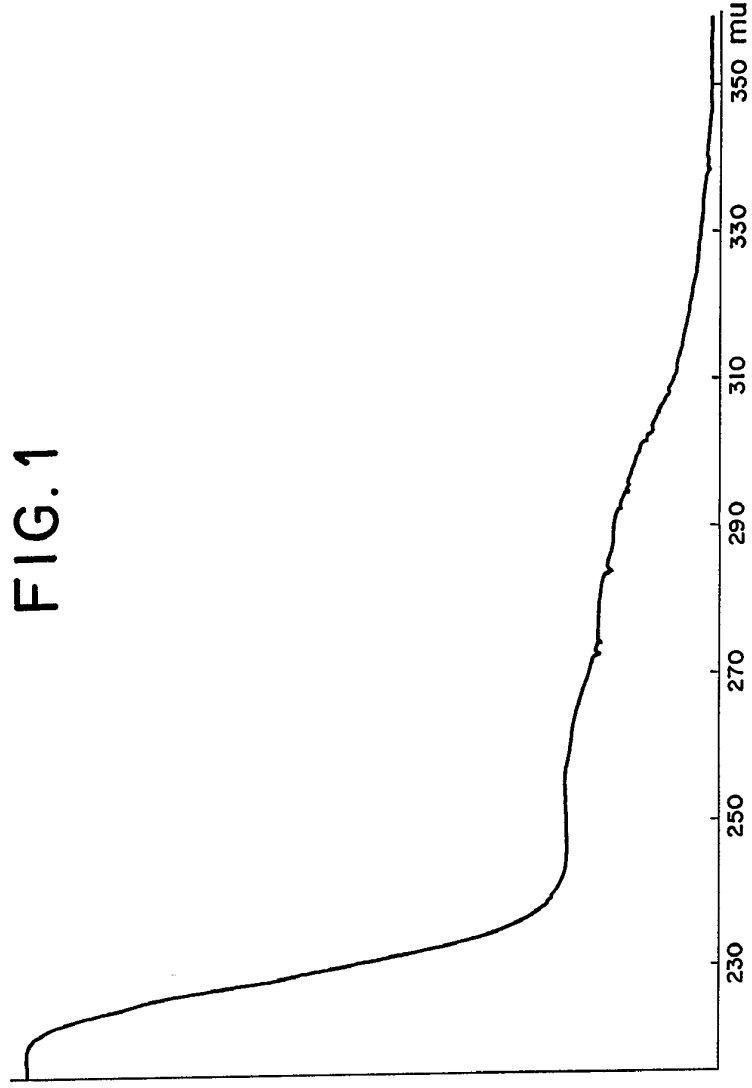
10 2.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, don-
de dicho microorganismo es un miembro de la especie Micromo-
nospora olivoasterospora.

15 3.- Un procedimiento según la Reivindicación 2, don-
de dicho microorganismo está seleccionado entre el grupo for-
mado por Micromonospora olivoasterospora ATCC 21819, Micromo-
nospora olivoasterospora ATCC 31009 y Micromonospora olivoas-
terospora ATCC 31010.

20 4.- Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN
PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO FORTIMICINA
A.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente Memoria descriptiva que consta de treinta y una pá-
ginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

25 Madrid, 22 de Julio de 1974
BERNARDO UNGREA
P.P.



ESCALA VARIABLE
Madrid, 22 de Julio de 1974
BERNARDO UNGRIA
P. P.

FIG. 1

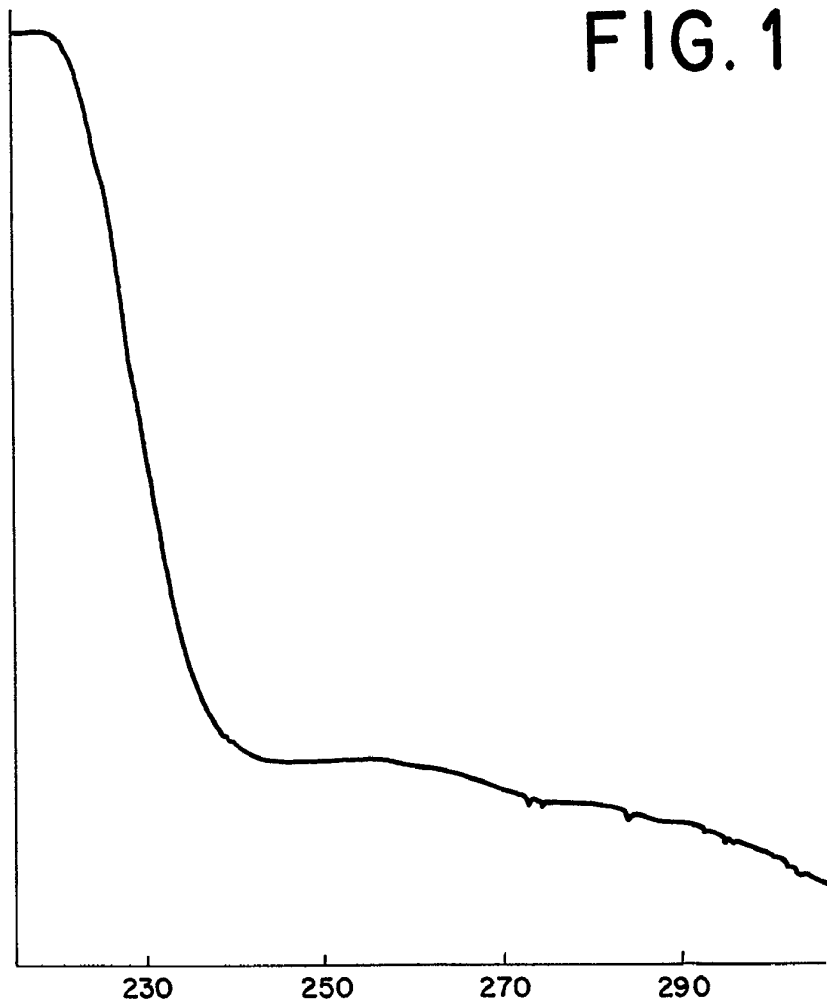
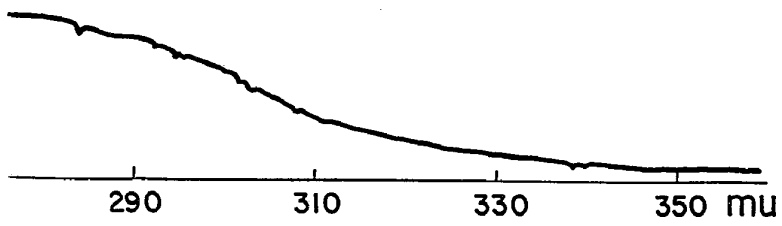
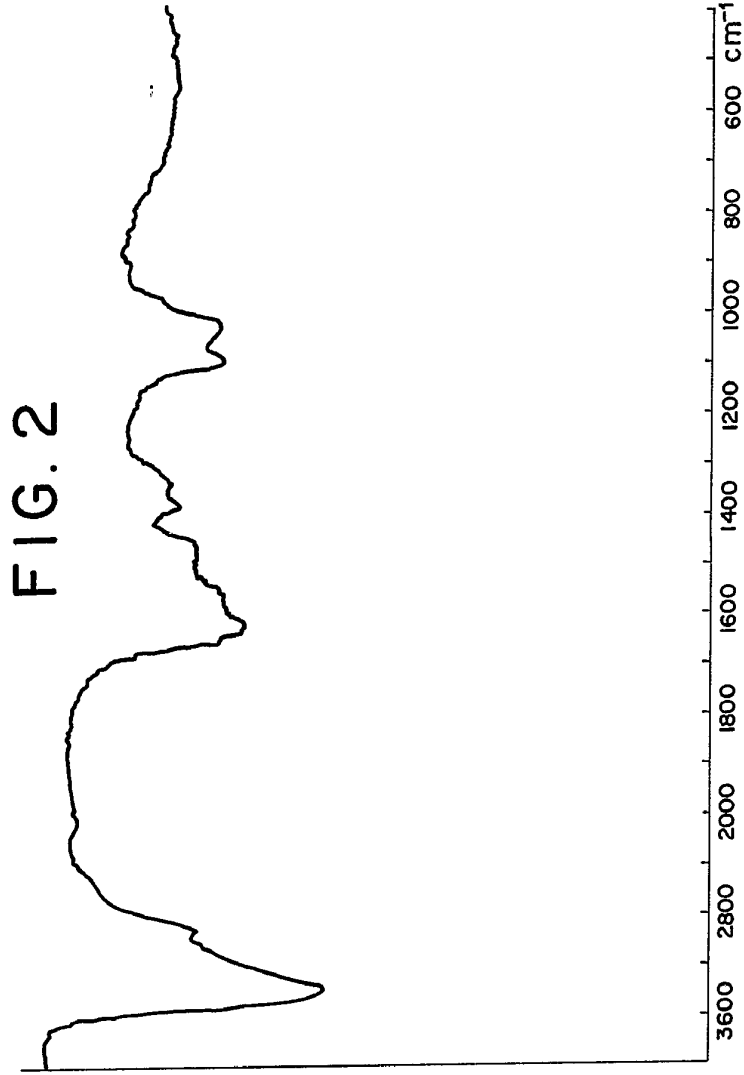


FIG. 1



ESCALA VARIABLE
Madrid, 22 de Julio de 1974
BERNARDO UNGRIA
p. p.



ESCALA VARIABLE
Madrid, 22 de Julio de 1974
BERNARDO UNGRIA
P. P.



FIG. 2



1600 1400 1200 1000 800 600 cm⁻¹

ESCALA VARIABLE

Madrid, 22 de Julio de 1974

BERNARDO UNGRIA

P. P.