

348202

P.- 36.934

PD-1300 A

Memoria descriptiva

29 DIC: 1957



para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de PARKE, DAVIS & COMPANY

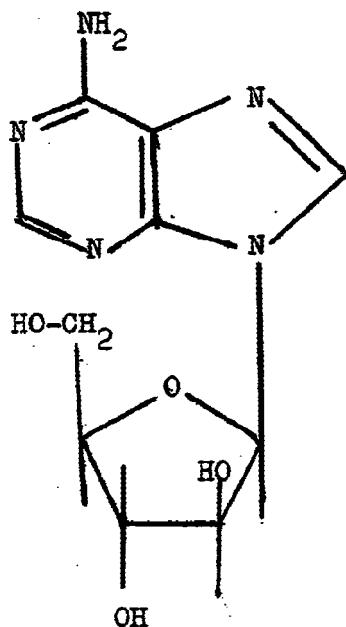
entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en Joseph Campau Avenue at the River, Detroit,
Michigan, Estados Unidos de América

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE 9-(BETA-D-ARABI-
NOFURANOSIL) ADENINA", (Clase Internacional C12d)



El presente invento se refiere a un procedimiento para la producción de 9-(beta-D-arabinofuranosil)adenina, que está representada por la fórmula



I

Más particularmente, el invento se refiere a un procedimiento de fermentación para la producción del compuesto de la fórmula precedente por cultivo de una cepa seleccionada del organismo Streptomyces antibioticus, que produce 9-(beta-D-arabinofuranosil)-adenina.

De acuerdo con el invento, se produce 9-(beta-D-arabinofuranosil)-adenina cultivando una cepa seleccionada del organismo Streptomyces antibioticus, que produce 9-(beta-D-arabinofuranosil)adenina, bajo condiciones artificiales, en un medio nutriente apropiado, hasta que se forma una cantidad sustancial de 9-(beta-D-arabinofuranosil)adenina.

Después del período de cultivo o incubación, se puede obtener 9-(beta-D-arabinofuranosil)adenina a par

30
22.12.67.



tir del medio por procedimientos que se describen seguidamente, y puede ser sometida al grado de purificación ulterior que se desee. El término "cepa del organismo Streptomyces antibioticus que produce 9-(beta-D-arabinofuranosil)adenina", tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones, significa una cepa de Streptomyces antibioticus la cual, cuando es hecha crecer o desarrollada bajo las condiciones artificiales aquí descritas provoca la formación de un mosto a partir del cual se puede obtener 9-(beta-D-arabinofuranosil)adenina por los procedimientos indicados.

Una cepa de Streptomyces antibioticus apropiada para los fines del invento ha sido aislada a partir de una muestra de tierra recogida cerca de Bosco Trecase, provincia de Nápoles, Campania, Italia. Cultivos de este organismo han sido depositados en United States Department of Agriculture, Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois, y son mantenidos en su colección de cultivo permanente como NRRL 3.238.

El organismo es un miembro aeróbico y esporulante en aire del orden de los Actinomicetales y pertenece al género Streptomyces, tal como se describe en la séptima edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957). Sus características de cultivo macroscópico sobre numerosos medios útiles para la identificación de miembros de este género, están mostradas en la Tabla 1.

TABLA 1. CARACTERISTICAS DE CULTIVO MACROSCOPICO DE LA CEPA DE STREPTOMYCES ANTIBIOTICUS QUE PRODUCE
9-(BETA-D-ARABINO-FURANOSIL)ADENINA QUE CORRESPONDE A NRRL 3.238.

Medio de cultivo	Color de			Otras características
	Micelio aereo	Reverso del micelio del substrato	Pigmento soluble	
Agar de extracto de levadura y extracto de malta	Pardo amarillento grisáceo	Gris parduzco	Pardo moderado	Rojizo con adición de NaOH(■)
Agar de harina de avena	Pardo amarillento grisáceo	Pardo oliva de claro a moderado	Grisáceo a pardo amarillento oscuro	Rojizo con adición de NaOH(■)
Agar de sales inorgánicas y almidón	Pardo amarillento grisáceo a claro	Gris oliva claro a pardo amarillento moderado.	Pardo amarillento claro a moderado	Rojizo con adición de NaOH (■)
Agar de glicerina y esparreguina	Pardo amarillento grisáceo	Amarillo grisáceo	Grisáceo a pardo amarillento oscuro	Rojizo con adición de NaOH (■)
Agar de almidón B	Pardo amarillento claro a grisáceo	Gris parduzco claro a pardo amarillento grisáceo claro	Ninguno	
Caldo de cultivo de nitrato orgánico	- -	- -	- -	Nitrato de reducido a nitrito



Tabla 1 (Continuación)

Gelatina	--	Pardo oscuro	Fuerte licuación
Leche	--	Pardo oscuro	Fuerte hidrólisis
Caldo de cultivo de trypton-extracto de levadura	--	Pardo oscuro	--
Agar de hierro, extracto de levadura y peptona	--	Negro	--
Agar de tirosina	--	Pardo oscuro	--
Agar de extracto de malta y extracto de levadura	--	--	A 28°C buen crecimiento a 37°C buen crecimiento a 45°C buen crecimiento a 50°C buen crecimiento

23



(M) Color del pigmento soluble.



Cuando el organismo es cultivado sobre ciertos medios de agar, el micelio aereo es usualmente pardo amarillento desde claro a grisaceo. El cultivo en estos medios de agar conduce a la formación de un pigmento soluble de pardo amarillento a pardo moderado que resulta rojizo cuando los medios son tratados con hidróxido de sodio. En medios que contienen manantiales de nitrógeno complejos, se forma un pigmento soluble pardo oscuro o negro.

Las cadenas de esporas son de rectas a tortuosas, ocasionalmente con rizos o lazos o con espirales sueltas o flojas. Con la edad, las cadenas resultan muy tortuosas e irregulares. Las esporas son blandas y de elípticas a globosas pueden variar entre un tamaño desde 0,7 a 1,2 micras x 0,9 a 1,7 micras.

En ensayos con utilización de carbono, se obtuvo un crecimiento desde bueno a bastante bueno con los siguientes manantiales de carbón individuales: glucosa, L-arabinosa, D-xilosa, i-inositol, D-manitol, D-fructosa, y ramnosa. Se obtuvo un crecimiento desde malo a bastante bueno con rafinosa, y se obtuvo mal crecimiento o ningún crecimiento con sacarosa y celulosa.

En la micromorfología, en el color del micelio aéreo y en la producción de melanina, el organismo se parece al Streptomyces antibioticus, y por lo tanto es considerado como un miembro de esta especie. En estudios comparativos de laboratorio, el presente organismo es similar al tipo de cultivo de S. Antibioticus, cepa IMRU 3435. Sin embargo, en ciertos aspectos, el presente organismo es claramente diferente de la cepa IMRU 3435, tal como se muestra en la Tabla 2, y por lo tanto es con-



2^a 016

siderado como una cepa nueva y claramente distinguida de S. antibioticus, estando representada la nueva cepa por el número de cultivo NRRL 3.238.

Tabla 2. COMPARACION DE LA CEPA DE STREPTOMYCES ANTIBIOTI-
CUS QUE PRODUCE 9-(BETA-D-ARABINOFURANOSIL) ADE-
NINA QUE CORRESPONDE A NRRL 3238 CON S. ANTIBIO-
TICUS QUE CORRESPONDE A IMRU 3.435.

Característica	<u>S. antibioticus</u> que corresponde a NRRL 3238	<u>S. antibioticus</u> que corresponde a IMRU 3435
Color del micelio aereo (M)	Pardo amarillento de claro a grisa- ceo	Gris medio a gris parduzco claro
Micromorfología del micelio aereo (M)	Rizos y espirales ocasionales	No se observan ri- zos ni espirales
<u>Pigmento soluble</u>		
Agar de extracto de levadura y extracto de malta	Pardo moderado	Amarillo grisaceo
Agar de harina de avena	Pardo amarillento de grisaceo a os- curo	Amarillo grisaceo
Agar de sales inor- gánicas y almidón	Pardo amarillento de claro a mode- rado	Ninguno
Agar de glicerina y esparraguina	Pardo amarillento de grisaceo a os- curo	Ninguno
Efecto de NaOH so- bre el pigmento so- luble de los medios anteriores	El pigmento resul- ta rojizo	Pigmento invariable
Agar de tirosina	Pardo oscuro	Ninguno
<u>Utilización de carbono</u>		
Sacarosa	Mala	Ninguna
Xilosa	Buena	Bastante buena
i-Inositol	Bastante buena	Buena



Tabla 2 (Continuación)

L-ramnosa	Bastante buena	Buena
Rafinosa	Mala a bastante buena	ninguna
Reducción de nitrato a nitrito	Negativa	Positiva
Licuación de gelatina	Fuerte	Débil
Hidrólisis de leche	Fuerte	Débil
Crecimiento sobre agar de extracto de levadura y extracto de malta a 45°C y a 50°C	Positivo	Negativo

(*) Tabla 1, en los primeros cinco medios.

De acuerdo con el invento, se produce 9-(beta-D-arabinofuranosil)adenina inoculando un medio nutriente acuoso con una cepa de Streptomyces antibioticus que produce 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina, conduciendo la fermentación bajo condiciones aerobias asépticas a una temperatura entre aproximadamente 20 y 45°C, hasta que se forma una cantidad sustancial de 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina en la mezcla de fermentación, y sometiendo a la mezcla de fermentación a subsiguiente tratamiento con el fin de obtener el producto deseado.

Para la inoculación, se pueden utilizar esporas o conidios del cultivo seleccionado de Streptomyces antibioticus. Se pueden emplear convenientemente suspensiones acuosas de las esporas o conidios que contienen una pequeña cantidad de jabón u otro agente humectante. Para grandes fermentaciones, es preferible utilizar caldos de cultivo del microorganismo aireados y agitados recientes y vigorosos.



Medios nutrientes acuosos apropiados son los que contienen manantiales asimilables de carbono y nitrógeno, y tienen preferiblemente un pH entre 6 y 8 aproximadamente. Manantiales de carbono que son asimilables y satisfactorios para la utilización, incluyen carbohidratos puros que pueden ser utilizados por el organismo, así como mezclas de carbohidratos comercialmente disponibles. Algunos ejemplos de los materiales, que son apropiados para este fin, son diversos azúcares, tales como glucosa, maltosa, lactosa y mannososa; almidón y almidones modificados; jarabe de maiz; líquidos de malta; melazas en mezcla con ron; glicerina y harina de maiz. La cantidad del carbohidrato presente en el medio nutriente no es particularmente crítica, y puede variar entre aproximadamente 0,5 y 5% en peso del medio. También se pueden utilizar cantidades algo fuera de este margen.

Los manantiales de nitrógeno del medio nutriente pueden ser de naturaleza orgánica, inorgánica, o inorgánica y orgánica mixta. Algunos ejemplos de las muchas sustancias nitrogenadas que se pueden emplear en el medio nutriente, son aminoácidos, peptonas, proteínas hidrolizadas y no hidrolizadas, harina de pescado, harina de soja, harina de cacahuete, harina de semilla de algodón, gluten de trigo, líquido de maceración de maiz, líquido de maceración de maiz deshidratado, extractos de carne, nitratos inorgánicos, urea, y sales de amonio. A causa de la naturaleza cruda de la mayor parte de los manantiales de nitrógeno fácilmente disponibles, la cantidad que se ha de añadir al medio varía de acuerdo con la pureza, y no es fácilmente posible especificar una cantidad definida



de material de manantial nitrogenado que deba ser añadido al medio. Sin embargo, se puede decir que, para fines prácticos, los materiales nitrogenados no necesitan pasar de 6% en peso del medio de fermentación total, y pueden estar presentes en una cantidad considerablemente menor.

La presencia de una cierta cantidad de sales minerales y vestigios de factores de crecimiento de composición desconocida es deseable con el fin de obtener los mejores rendimientos de 9-(beta-D-arabinofuranosil)-adenina. Muchos materiales crudos fácilmente disponibles, tales como líquido de maceración de maíz, preparados de levadura, harina de soja, residuos de fermentación de melazas, y otros productos de carácter similar contienen dichas sales inorgánicas y factores de crecimiento, y es deseable la inclusión de uno o más de estos materiales en el medio de fermentación. Con el fin de asegurar la presencia de cantidades adecuadas de los componentes minerales del medio, también es conveniente en muchos casos añadir algunas sales inorgánicas, tales como cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, fosfato de potasio, acetato de sodio, carbonato de calcio, y sulfato de magnesio, así como cantidades de vestigios de minerales tales como cobre, cobalto, manganeso, zinc y hierro. La concentración preferida de una sal mineral dada está entre 0,1 y 1% en peso del medio nutriente.

El cultivo de la cepa seleccionada de Streptomyces antibioticus en el medio nutriente acuoso puede realizarse de un cierto número de maneras diferentes. Por ejemplo, el organismo puede ser cultivado bajo condiciones aerobias sobre la superficie del medio; o puede ser

30
22.12.67.



cultivado por debajo de la superficie del medio, es decir en estado sumergido, con la condición de que se proporcione un manantial adecuado de oxígeno.

El método preferido para producir 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina a una gran escala es por la fermentación de la cepa de Streptomyces antibioticus que produce 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina en un cultivo sumergido o profundo. De acuerdo con esta realización del invento, un medio nutriente acuoso estéril es inoculado con el cultivo seleccionado, y es incubado con agitación y aireación bajo condiciones asépticas a una temperatura entre aproximadamente 20 y 45°C, preferiblemente cerca de 33 a 40°C, hasta que se encuentra en el líquido de cultivo una cantidad sustancial de 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina. El espacio de tiempo requerido para el máximo rendimiento varía con el tamaño y el tipo de equipos que se utilizan, con las velocidades de agitación y aireación, con el cultivo del organismo específico y con otros factores. En fermentaciones comerciales a gran escala, realizadas en fermentadores del tipo de depósito, se alcanza usualmente la producción máxima entre aproximadamente 3 a 7 días. También se pueden utilizar períodos de fermentación más cortos, pero usualmente producen un menor rendimiento. Cuando la fermentación se lleva a cabo en matraces agitados, el tiempo requerido para la producción máxima puede ser algo más largo que cuando se utilizan grandes depósitos de fermentación.

Bajo las condiciones de cultivo sumergido, el microorganismo se desarrolla en forma de partículas relativamente separadas o individuales dispersadas por todo el

30
22.12.67.



medio nutriente, en contraste con la película relativamen-
te continua presente sobre la superficie del medio en el
método de cultivo superficial. En virtud de esta distribu-
ción del organismo por el medio, se pueden utilizar gran-
des volúmenes del medio nutriente inoculado en el cultivo
del organismo en los depósitos y cubas empleados normal-
mente en la industria de la fermentación. Fermentadores
de cuba estacionarios, equipados con dispositivos de agi-
tación y aireación son particularmente apropiados para la
producción a gran escala, aunque también se pueden utili-
zar equipos de fermentación de otros diseños. Para la pro-
ducción de menores cantidades de producto, o para la pre-
paración de cultivos del organismo que han de ser utili-
zados como inóculos para fermentaciones a gran escala, el
método de cultivo sumergido puede realizarse en pequeños
matraces o botellas que son sacudidas o agitadas por me-
dios mecánicos apropiados.

En el método de cultivo sumergido, la agita-
ción y la aireación de la mezcla de cultivo pueden reali-
zarse de un cierto número de maneras. La agitación puede
ser proporcionada por turbinas, paletas planas, paletas de
impulsión u otros dispositivos de agitación apropiados,
removiendo o agitando el aparato fermentador propiamente
dicho, por diversos dispositivos de bombeo, o por el paso
de aire u oxígeno a través del medio. La aireación puede
llevarse a cabo inyectando aire u oxígeno dentro de la mez-
cla de fermentación a través de tuberías abiertas, tube-
rias perforadas o tuberías que contienen una sección de
difusión porosa; o puede llevarse a cabo también por pul-
verización, salpicado o rociado o esparcido del medio en

30
22.12.67.



o a través de una atmósfera que contiene oxígeno.

Una alternativa del método de cultivo sumergido preferido es el método de cultivo en la superficie, para producir 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina, de acuerdo con el cual una capa poco profunda, usualmente de menos de 2 cm de altura, de un medio nutriente acuoso estéril es inoculada con una cepa de Streptomyces antibioticus que produce 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina, y la mezcla inoculada es incubada bajo condiciones aerobias a una temperatura entre aproximadamente 20 y 45°C. Entonces, se obtiene el producto de una manera similar a la descrita para el método de cultivo sumergido.

Después de completarse la fase de fermentación del procedimiento, se puede obtener el producto deseado de un cierto número de maneras. En el caso del método de cultivo sumergido, el método preferido es el siguiente. El micelio es separado por medios tales como filtración o centrifugación. La torta de filtro es bien lavada con agua, los líquidos de lavado son combinados con el mosto filtrado, y los líquidos combinados son concentrados bajo presión reducida hasta aproximadamente una doceava parte del volumen original. La solución concentrada es enfriada hasta aproximadamente 5°C durante un extenso período (desde varias horas a varios días, dependiendo del volumen), y el sólido que precipita es aislado por filtración con la ayuda de tierra de diatomeas. Entonces, la torta de filtro es bien extraída con agua hirviente, y los extractos combinados son enfriados hasta aproximadamente 5°C, hasta que se completa la precipitación. La 9-(beta-D-arabinofuranosil)-adenina cristalina que preci-

30
22.12.67.



pita es aislada por filtración y es purificada adicionalmente por cristalizaciones sucesivas a partir de agua hirviente.

Alternativamente, el producto deseado puede obtenerse a partir del método de cultivo sumergido empleando las técnicas de adsorción siguientes. También, después que se completa la fermentación, el micelio es separado por medios tales como filtración o centrifugación. El producto crudo es adsorbido entonces tratando el mosto filtrado con carbón activado, u otro agente adsorbente. La adsorción puede llevarse a cabo de forma discontinua o por flujo continuo a través de una columna de adsorción. En el método discontinuo preferido, se añade al mosto filtrado de 0,1 a 0,6%, preferiblemente 0,35 a 0,40%, en peso/volumen, del adsorbente de carbón preferido, y la mezcla resultante es agitada durante 1 a 3 horas. En algunos casos, puede ser deseable eliminar impurezas desde el mosto filtrado antes del tratamiento con carbón, por extracción del mismo con un disolvente orgánico inmiscible, tal como dicloruro de etileno o acetato de etilo, o por tratamiento del mismo con una resina sintética de intercambio catiónico en la forma de sodio. El producto crudo es aislado eluyendo el adsorbente de carbón con acetona acuosa o con un alcohol inferior acuoso y evaporando el eluado bajo presión reducida. El residuo sólido obtenido es purificado entonces por sucesivas cristalizaciones a partir de agua o un alcohol inferior, o por el siguiente procedimiento. El residuo sólido es extraído con un alcohol líquido inmiscible con agua tal como alcohol n-butílico, y el extracto es vertido sobre una columna de alúmina (pH 5 a 6). La colum



na de alúmina es eluída con etanol acuoso al 95%, el elua
to es evaporado, y el sólido obtenido es cristalizado a
partir de agua o un alcanol inferior para dar la 9-(beta-
D-arabinofuranosil) adenina deseada.

5 El producto del procedimiento del invento,
9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina, es útil como agente
antivirus que es activo "in vitro" e "in vivo" tanto con-
tra los virus de herpes como de vacunas.

10 El invento es ilustrado por los siguientes
ejemplos.

Ejemplo 1

15 Se preparan cultivos inclinados de agar esté-
ril utilizando el medio de esporulación de Streptomyces de
Hickey y Tresner [R. J. Hickey y H. D. Tresner, J. Bact.,
volumen 64, páginas 891-892 (1952)]. Cuatro de estos cul-
tivos inclinados son inoculados con esporas liofilizadas
de Streptomyces antibioticus que corresponden a NRRL 3238,
incubadas a 28°C durante 7 días o hasta que está bien
avanzado el crecimiento de esporas aéreas, y después son
20 almacenados a 5°C. Las esporas de los cuatro cultivos in-
clinados son suspendidas en 40 ml de una solución estéril
al 0,1% de heptadecil sulfato de sodio.

Se prepara un medio nutriente que tiene la si-
guiente composición:

25	Monohidrato de glucosa	2,0%
	Harina de soja, extraída con disolvente, con 44% de proteína	1,0%
	Peptona animal. (Protopeptona de Wilson 159)	0,5%
	Cloruro de amonio	0,2%
30	Cloruro de sodio	0,5%

22.12.67.

Carbonato de calcio



0,25%

Agua, hasta constituir 100%

El pH del medio es ajustado con solución 10 normal de hidróxido de sodio hasta pH 7,5.

5 Se introducen 12 litros de este medio en un fermentador de acero inoxidable de 30 litros. El medio es esterilizado calentándolo a 121°C durante 90 minutos, es dejado enfriar, es inoculado con 40 ml de la suspensión de esporas antes descrita, y es incubado a 25-27°C durante 10 32 horas, al mismo tiempo que es agitado a 200 r.p.m. suministrándose aire a la velocidad de 12 litros por minuto. Se añaden en porciones aproximadamente 38 g de una mezcla de manteca de cerdo y aceites minerales que contienen monoglicéridos y diglicéridos durante este tiempo, para 15 evitar una excesiva formación de espuma.

Dieciseis litros de un medio nutriente que tiene la composición antes descrita son introducidos en cada uno de cuatro fermentadores de acero inoxidable de 30 litros. El pH del medio en cada fermentador es ajustado con solución 10 normal de hidróxido de sodio hasta pH 7,5 y cada uno es esterilizado calentándolo a 121°C durante 20 90 minutos. Después de enfriar, el medio de cada fermentador es inoculado con 800 ml de la mezcla de fermentación antes descrita, y cada uno es incubado a 25-27°C durante 25 96 horas mientras es agitado a 200 r.p.m. suministrándose aire a la velocidad de 16 litros por minuto. Se añaden en porciones durante este tiempo aproximadamente 170 g de la mezcla antiespumante antes descrita al medio de cada fermentador.

30 Las mezclas de fermentación de los cuatro fer

22.12.67.



mentadores son combinadas y filtradas con la ayuda de tierra de diatomeas. Se puede utilizar un material tal como Celite 545. El filtrado es concentrado bajo presión reducida hasta un volumen de 10 litros, y el concentrado es tratado con 200 g de carbón activado (por ejemplo Darco G-60), es agitado a la temperatura ambiente durante 1 hora, y es filtrado. La torta de carbón es lavada con 7,5 litros de agua, y después es extraída con 3 porciones de 10 litros de acetona acuosa al 50%. Los tres extractos en acetona acuosa son combinados, concentrados bajo presión reducida hasta aproximadamente 1 litro y son enfriados rápidamente hasta 5°C durante 48 horas. La 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina sólida que precipita es aislada y purificada por sucesivas cristalizaciones a partir de metanol hirviente y a partir de agua hirviente; p. de f. 262 - 263°C.

En el precedente procedimiento, cuando se aumenta la temperatura de fermentación en las dos etapas de fermentación desde 25-27°C hasta 36 a 38°C, se obtiene el mismo producto de 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina con mayores rendimientos.

Ejemplo 2

Se prepara un medio nutriente que tiene la siguiente composición:

25	Monohidrato de glucosa	2,0%
	Harina de soja, extraída con disolvente, con 44% de proteína	1,0%
	Peptona animal (Protopeptona de Wilson 159)	0,5%
	Cloruro de amonio	0,2%
30	Cloruro de sodio	0,5%

22.12.67.



Carbonato de calcio

Agua hasta constituir 100%

El pH del medio es ajustado con solución 10 normal de hidróxido de sodio hasta pH 7,5.

5 Cuarenta y cuatro litros de este medio son colocados en un fermentador de acero inoxidable de 132 litros. El medio es esterilizado calentándolo hasta 121°C durante 60 minutos, es dejado enfriar, y es inoculado con 40 ml de una suspensión de esporas preparada tal como se describe en el primer párrafo del Ejemplo 1 anterior. Se añade una mezcla antiespumante (150 ml) que consiste en 10 manteca de cerdo y aceites minerales que contienen monoglicéridos y diglicéridos (por ejemplo el agente desespumante no comestible nº 51 de Swift), y la mezcla es incubada a 26-27°C durante 59 horas con aireación a una velocidad de 177 litros por minuto.

15 Se introducen 1320 litros de un medio nutriente que tiene la composición antes descrita en un fermentador con revestimiento de Inconel de 2200 litros. El medio es ajustado hasta pH 7,5 con hidróxido de sodio acuoso 10 20 normal, y después es esterilizado calentándolo hasta 121°C durante 30 minutos. Después de enfriar, el medio es inoculado con 44 litros de la mezcla de fermentación antes descrita, se añaden aproximadamente 1000 ml de la mezcla antiespumante antes descrita, y la mezcla es incubada a 25 24-25,5°C durante 24 horas con agitación a 84 r.p.m., y con aireación a una velocidad de 1274 litros por minuto. Durante este período, se añaden en porciones 513 ml adicionales de agente antiespumante.

30 5280 litros de un medio nutriente que tiene la

22.12.67.



misma composición antes descrita son introducidos en cada uno de dos fermentadores con revestimiento de Inconel de 8800 litros. El medio de cada fermentador es ajustado hasta pH 7,5 con hidróxido de sodio acuoso 10 normal y es esterilizado por calentamiento hasta 121°C durante 30 minutos. Después de enfriar, cada uno es inoculado con 660 litros de la mezcla de fermentación descrita en el párrafo precedente, se añaden a cada uno 10 litros de agente antiespumante, y cada uno es incubado a 24,5-26,5°C durante 95 horas con agitación a 125 r.p.m. y aireación a una velocidad de 3396 litros por minuto. Durante este período se añaden, a solicitud, 40 a 46 litros adicionales de agentes antiespumante.

Las mezclas de fermentación procedentes de los dos fermentadores son combinadas, ajustadas a pH 7,2 con hidróxido de sodio acuoso 10 normal, son suspendidas con 135 Kg de tierra de diatomeas, y son filtradas. El filtrado es concentrado bajo presión reducida hasta un volumen de 2200 litros, y el concentrado es tratado con 39,2 Kg de carbón activado, es agitado a la temperatura ambiente durante 1 hora y es filtrado. La torta de carbón es lavada con 1760 litros de agua, y después es extraída con tres porciones de 2200 litros de acetona acuosa al 50%. Los tres extractos en acetona acuosa son combinados, son concentrados bajo presión reducida hasta un volumen de 198 litros, y son enfriados rápidamente hasta 5°C durante 48 horas. La 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina sólida que precipita es aislada y cristalizada sucesivamente a partir de metanol y a partir de agua; p. de f. 262-263°C.

En el precedente procedimiento, se obtienen



rendimientos mejorados del producto de 9-(beta-D-arabino-
 furanosil) adenina cuando la temperatura de incubación es
 aumentada en la primera etapa de fermentación desde 26 a
 27°C hasta 29 a 30°C, en la segunda etapa de fermentación
 desde 24 a 25,5°C hasta 29 a 30°C, y en la etapa de fermen-
 tación final desde 24,5 a 26,5°C hasta 36 a 38°C.

Ejemplo 3

Se prepara un medio nutriente que tiene la
 siguiente composición:

10	Glucosa monohidratada	2,0%
	Harina de soja, extraída con disolvente, con 44% de proteínas	1,0%
	Peptona animal (Protopeptona de Wilson 159)	0,5%
	Cloruro de amonio	0,2%
15	Cloruro de sodio	0,5%
	Carbonato de calcio	0,25%
	Agua hasta constituir 100%	

El pH del medio es ajustado con solución 10
 normal de hidróxido de sodio, a pH 7,5.

20 Doce litros de este medio son introducidos en
 un fermentador de acero inoxidable de 30 litros. El medio
 es esterilizado calentándolo hasta 121°C durante 90 minu-
 tos, es dejado enfriar, y es inoculado con una suspensión
 de esporas de 40 ml preparada tal como se describe en el
 primer párrafo del Ejemplo 1 anterior. El medio inoculado
 25 es incubado entonces a 29-30°C durante 36 horas mientras
 es agitado a 200 r.p.m, suministrándose la aireación a la
 velocidad de 12 litros por minuto. Se añaden en porciones
 durante este tiempo aproximadamente 44 g de una mezcla de
 30 manteca de cerdo y aceites minerales que contienen mono-

29 012



glicéridos y diglicéridos para evitar una excesiva formación de espuma.

Se prepara seguidamente un medio nutriente que tiene la siguiente composición:

5	Glucosa monohidratada	2,0%
	Harina de soja, extraída con disolvente, con 44% de proteínas	2,0%
	Cloruro de sodio	0,5%
	Carbonato de calcio	0,25%
	Agua hasta constituir 100%	

10 El pH del medio es ajustado con solución 10 normal de hidróxido de sodio a pH 7,5.

Cuarenta y cuatro litros de este segundo medio son introducidos en un fermentador de acero inoxidable de 132 litros. El medio es esterilizado calentándolo hasta 121°C durante 60 minutos, es dejado enfriar, y es
15 inoculado con aproximadamente 400 ml de la mezcla de fermentación antes descrita. Se añade una mezcla antiespumante (150 ml) que consiste en manteca de cerdo y aceites minerales que contienen monoglicéridos y diglicéridos (por
20 ejemplo el desespumante no comestible nº 51 de Swift), y la mezcla es incubada a 29-30°C durante 24 horas con aireación a la velocidad de 178,5 litros por minuto.

Mil trescientos veinte litros de un medio nutriente que tiene la misma composición que el medio de
25 siembra de 44 litros antes descrito, son introducidos en un fermentador con revestimiento de Inconel de 2200 litros. El medio es ajustado a pH 7,5 con hidróxido de sodio acuoso 10 normal y después es esterilizado calentándolo hasta 121°C durante 30 minutos. Después de enfriar, el
30 medio es inoculado con 44 litros de la mezcla de fermenta

22.12.67.



ción descrita inmediatamente antes, se añaden aproximada-
mente 1000 ml de la mezcla antiespumante antes descrita,
y la mezcla es incubada a 30-31°C durante 24 horas con
agitación a 84 r.p.m. y con aireación a una velocidad de
1273,5 litros por minuto. Durante este período, se añaden
en porciones 4000 ml adicionales de agente antiespumante.

Cinco mil doscientos ochenta litros de un me-
dio nutriente que tiene la misma composición que los me-
dios de 44 litros y 1320 litros antes descritos, son in-
troducidos en cada uno de dos fermentadores con revesti-
miento de Inconel de 8800 litros. El medio de cada fermen-
tador es ajustado hasta pH 7,5 con hidróxido de sodio acu-
so 10 normal y es esterilizado calentándolo hasta 121°C
durante 30 minutos. Después de enfriar, cada uno es inocu-
lado con 660 litros de la mezcla de fermentación antes des-
crita en el párrafo precedente, se añaden 10 litros de
agente antiespumante a cada uno de ellos, y cada uno es
incubado a 36,5-38°C durante 144 horas con agitación a 125
r.p.m. y aireación a una velocidad de 3396 litros por mi-
nuto. Durante este período, se añaden, a solicitud, 140 a
196 litros adicionales de agente antiespumante.

Las mezclas de fermentación procedentes de
los dos fermentadores son combinadas, son filtradas a tra-
vés de un filtro prensa de placa y bastidor con la ayuda
de tierra de diatomeas, y la torta de filtro es lavada
con 440 litros de agua. El filtrado y el agua de lavado
son combinados, los líquidos combinados son concentrados
bajo presión reducida hasta aproximadamente una doceava
parte del volumen original y la solución concentrada es en-
friada hasta 5°C durante 72 horas. El sólido que precipita

29 018



de la solución enfriada es aislado por filtración con la ayuda de tierra de diatomeas, la torta de filtro es extraída dos veces con agua hirviente, primero con 123,2 litros y después con 176 litros, y los extractos acuosos combinados son enfriados hasta 5°C durante 72 horas. La 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina cristalina que precipita desde la solución enfriada es aislada por filtración y purificada por cristalización dos veces a partir de agua hirviente, la primera cristalización a partir de 123,2 litros y la segunda a partir de 88 litros de agua; p. de f. 262-263°C.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 30 de Diciembre de 1966, bajo el número 606.044 y 29 de Septiembre de 1967, número 671.557, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

- 1.- Procedimiento para la producción de 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina, caracterizado porque un medio nutriente acuoso es inoculado con una cepa de

24
22.12.67.



Streptomyces antibioticus que produce 9-(beta-D-arabino-furanosil) adenina, y el medio inoculado es incubado a una temperatura entre aproximadamente 20 y 45°C bajo condiciones aerobias.

5 2.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el medio nutriente acuoso tiene un pH en tre 6 y 8.

10 3.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el medio nutriente acuoso contiene manantales de carbono y de nitrógeno asimilables y sales inorgánicas añadidas.

15 4.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el medio inoculado es incubado a una temperatura entre 33 y 40°C.

20 5.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el medio inoculado es incubado bajo condiciones de cultivo sumergido.

6.- Procedimiento para la producción de 9-(beta-D-arabinofuranosil) adenina.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

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

Madrid,

29 DIC. 1957

P. A.

Alberto de Vazquez
Alberto de Vazquez
P. A.