



358170

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., INC.

Residencia: RAHWAY, NEW JERSEY 07065, EE.UU.

Enunciado: "UN PROCEDIMIENTO DE RECUPERACION Y  
PURIFICACION DE UN ANTIBIOTICO".

Prioridad: de la solicitud de patente estadounidense  
Nº 699.376 del 22 de enero de 1.968.

R/G.

**POOR  
QUALITY**



14

#### ANTECEDENTES DEL INVENTO

1

5

10

15

El Antibiótico 833A es un nuevo y útil antibiótico formado por cultivo, en condiciones controladas, de una variedad previamente desconocida de microorganismo y se produce durante la fermentación aerobia de un medio nutritivo acuoso adecuado. El caldo de fermentación y las soluciones crudas del antibiótico deben ser tratados para obtener el antibiótico en forma purificada. El Antibiótico 833A es un material altamente polar, como indica la casi completa ausencia de adsorción de las soluciones acuosas por el carbón activo a pH 5. No es adsorbido en las arcillas ácidas y no es extraído fácilmente, incluso en presencia de aminas orgánicas, por los disolventes polares, como el fenol. El presente invento está dirigido a los procedimientos de recuperación de Antibiótico 833A por cromatografía del caldo de fermentación o solución cruda del antibiótico sobre una resina cambiadora de ión.

#### RESUMEN

20

25

Este invento se refiere a un método de recuperación de una nueva sustancia antibiótica denominada Antibiótico 833A o, por su nombre químico, ácido l-cis-1,2-epoxi-1-propilfosfónico, a partir de soluciones acuosas que contienen dicho antibiótico, por cromatografía del caldo de fermentación en el que es producido el antibiótico o de una solución del antibiótico parcialmente purificado sobre una re-



1       sina cambiadora de anión o de catión, con posterior elu-  
ción del adsorbato en resina con agua o una solución sali-  
na acuosa o hidroalcohólica. El Antibiótico 833A es muy  
eficaz en la inhibición del crecimiento de varios microorga-  
5       nismos Gram-positivos y Gram-negativos.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

El Antibiótico 833A es una sustancia ácida, soluble  
en agua, que forma sales con las bases inorgánicas y orgá-  
nicas. En el presente invento se ha encontrado que el Anti-  
10       biótico 833A puede ser purificado cromatografiando el anti-  
biótico impuro en forma de caldo de fermentación crudo o en  
un estado parcialmente purificado, por ejemplo en forma de  
su sal sódica o potásica, sobre una resina cambiadora de  
ión y eluyendo el material purificado con un eluyente ade-  
15       cuado tal como soluciones acuosas o hidroalcohólicas de clo-  
ruro sódico, cloruro potásico, cloruro amónico, tri-(hidro-  
ximetil)aminometano/HCl y similares y en algunos casos por  
elución con agua. Para esta purificación pueden emplearse  
resinas cambiadoras de anión y de catión. Cuando se utiliza  
20       una resina cambiadora de anión, es preferible emplear una  
resina fuertemente básica aunque también se pueden emplear  
resinas débilmente básicas; cuando se emplea una resina cam-  
biadora de catión, es preferible usar una resina fuertemen-  
te ácida. En general, se emplea una resina compuesta de gru-  
25       pos cambiadores de amonio cuaternario unidos a una red poli



1 mérica de estireno-divinilbenceno (Dowex 1 x 2) en el ciclo de cloruro como resina básica cambiadora de anión, pero también se pueden emplear resinas compuestas de grupos polialquilamina unidos a una red polimérica de estireno-  
5 divinilbenceno y resinas acrílicas reticuladas; como resina ácida cambiadora de catión se utiliza generalmente una resina del tipo de sulfonato con una matriz de estireno-divinilbenceno (Dowex 50 x 2) en la forma hidrógeno.

10 Un método preferido para la recuperación de antibiótico purificado consiste en pasar una solución del antibiótico, tal como el caldo de fermentación, cuyo pH ha sido ajustado a 7 con solución acuosa de una base, como hidróxido sódico o hidróxido amónico, a través de una columna que contiene una resina cambiadora de anión del tipo de amonio  
15 cuaternario. Aunque generalmente el pH del caldo se ajusta a 7, puede utilizarse directamente el caldo crudo sin ajustar, el pH. Generalmente la columna se lava con agua para eliminar el caldo residual. El adsorbato de resina resultante se eluye después con una solución salina alcohólica como  
20 solución de cloruro amónico al 3 % en metanol al 90 %. Los eluatos se recogen en fracciones, dependiendo el tamaño de la fracción del tamaño de la columna empleada. La bioactividad de los eluatos se mide analizando el eluato mediante un ensayo normalizado utilizando Proteus vulgaris como organismo de ensayo. Las fracciones que contienen la mayor  
25



1 parte del material activo se concentran después, general-  
mente en vacío, para eliminar cualquier disolvente orgáni-  
co y el concentrado se diluye con agua. A continuación se  
determina la actividad del concentrado por el procedimien-  
5 to de ensayo normalizado.

El Antibiótico 833A así obtenido puede ser purifica-  
do todavía más pasando las fracciones activas concentradas  
combinadas a través de una resina de filtración en forma de  
gel tal como gel de poliacrilamida. En general se emplea un  
10 gel de 50-100 mallas que permite el fraccionamiento, la de-  
salinificación y la concentración de sustancias con pesos  
moleculares comprendidos entre 200 y 2000, existente con el  
nombre comercial de Bio-Gel P-2 de los Bio Rad Laboratories,  
Richmond, California, aunque también se pueden utilizar ge-  
15 les de 50-200 mallas. La malla no es un factor limitador y  
el número de malla particular empleado dependerá del tamaño  
de la columna que se utilice. Los eluatos se recogen después  
en fracciones, se analizan las fracciones y se combinan las  
más activas.

20 Puede conseguirse una nueva purificación del antibió-  
tico así obtenido concentrando las fracciones obtenidas del  
gel de poliacrilamida y pasando los concentrados a través  
de una columna que contiene una resina cambiadora de ión  
fuertemente ácida en la forma hidrógeno, del tipo de sulfonato  
25 con una matriz de estireno-divinilbenceno. El adsorbato en

74 SEP



1 resina resultante se desarrolla después con agua y el elua  
to se recoge en fracciones. El pH de las fracciones más ac  
tivas puede ser ajustado después separadamente al valor 7  
con una base. Para la valoración pueden emplearse bases inor  
5 gánicas como el hidróxido sódico y el hidróxido potásico y  
bases orgánicas como la piridina y la trietilamina. Después  
de la determinación utilizando el procedimiento de análisis  
normalizado, se combinan las fracciones más activas para ob  
tener una solución acuosa del Antibiótico 833A. Cuando se  
10 desea el antibiótico sólido, puede concentrarse la solución  
acuosa y secarse por congelación. El antibiótico seco así  
obtenido se puede utilizar después para determinar el diagra  
ma de sensibilidad en el espectro bacteriano y en los ensa  
yos de resistencia cruzada así como la eficacia in vivo del  
15 antibiótico.

Otra posibilidad consiste en purificar la sal obtenida  
por el procedimiento anterior por cromatografía en una co  
luna de resina cambiadora de anión compuesta de grupos cam  
biadores de amonio cuaternario unidos a una red polimérica  
20 de estireno-divinilbenceno (Dowex 1 x 2) en el ciclo de clo  
ruo. El tamaño de la columna dependerá de la cantidad de  
material que se esté cromatografiando. En general, para una  
muestra de unos 36 mg es suficiente una columna de 84 cm  
por 1,5 cm. Generalmente se utiliza una resina de 50-100 ma  
25 llas, pero también se pueden emplear resinas de 50-400 ma



1 llas. Cuando se sigue este procedimiento de purificación,  
la resina se lava primero con una solución acuosa diluí-  
da de una sal como cloruro sódico, cloruro potásico, clo-  
ruro amónico o soluciones de sales de bases orgánicas,  
5 como piridina o tri(hidroximetil)aminometano, con objeto  
de equilibrar la resina. La sal de Antibiótico 833A se  
disuelve después en la solución salina acuosa diluída y  
la solución se vierte sobre la resina. A continuación se  
desarrolla la columna con solución equilibradora y el elua  
10 to se recoge en fracciones. Después se analizan las frac-  
ciones para determinar la zona general de bioactividad y  
las fracciones activas se combinan y concentran. A conti-  
nuación el concentrado se filtra a través de una resina de  
filtración en forma de gel, tal como gel de poliacrilamida  
15 (Bio-Gel P-2) para separar el antibiótico de la sal. El ta-  
maño de la columna empleada dependerá de la cantidad de ma-  
terial a cromatografiar. Las fracciones recogidas se anali-  
zan frente a Proteus vulgaris MB-838 para determinar la bio-  
actividad. Las fracciones activas se combinan, concentran  
20 y secan por congelación.

En el procedimiento anterior, cuando se emplea una  
solución de tri(hidroximetil)aminometano/HCl en lugar de,  
por ejemplo, solución diluída de cloruro sódico, para lavar  
y equilibrar la resina, puede emplearse como eluyente un  
25 tampón de tri-(hidroximetil)aminometano/HCl pH 8,0 (0,1 M



1 Cl<sup>-</sup>). La sal de Antibiótico 833A, por ejemplo la sal sódica, se disuelve después en el tampón y la solución se vierte sobre la columna de resina. La columna se desarrolla con el mismo tampón y el eluyente se recoge en varias fracciones. A continuación se analizan las fracciones frente a Proteus vulgaris MB-838 para determinar la bioactividad y las fracciones activas se combinan, concentran y secan. El residuo seco se disuelve después en agua y la solución acuosa se filtra sobre una resina de filtración en forma de gel, como gel de poliacrilamida (Bio-Gel P-2), para separar el antibiótico del tampón. Las fracciones activas, analizadas frente a Proteus vulgaris MB-838, se combinan y concentran y el concentrado se seca por congelación.

15 La sal de tri-(hidroximetil)aminometano de Antibiótico 833A así obtenida puede ser purificada todavía más por cromatografía sobre una columna de resina cambiadora de catión fuertemente ácida, compuesta de grupos cambiadores de ácido sulfónico nuclear unidos a una red polimérica de estireno-divinilbenceno (Dowex 50) en el ciclo de sodio para sustituir el grupo tri-(hidroximetil)aminometano por sodio. El disolvente de la sal de tri-(hidroximetil)aminometano es generalmente agua y el efluente que contiene la sal sódica de Antibiótico 833A se analiza y se seca por congelación para obtener la sal sódica sólida. El procedimiento anterior puede ser  
25 utilizado para obtener otras sales de Antibiótico 833A, ade



1 más de la sal sódica, empleando una resina cambiadora de  
cación con el catión deseado.

Los caldos de fermentación de Antibiótico 833A uti-  
lizados como material de partida para los procedimientos de  
5 purificación aquí descritos presentan unas actividades que  
oscilan entre 1 y 10 unidades por mililitro cuando se anali-  
zan siguiendo el procedimiento normalizado que utiliza Pro-  
teus vulgaris como organismo de ensayo.

El Antibiótico 833A se determina convenientemente me-  
10 diante un procedimiento de disco-placa utilizando Proteus  
vulgaris MB-838 (ATCC 21100 y NRRL B-3361) como organismo  
de ensayo. El cultivo de ensayo se mantiene como cultivo  
inclinado en agar nutritivo (Difco) más 0,2 % de extracto  
de levadura (Difco). Los tubos inclinados inoculados se in-  
15 cuban a 37°C durante 18-24 horas y se conservan a las tempe-  
raturas del refrigerador durante una semana, preparándose  
tubos inclinados frescos cada semana.

El inoculum para las placas de ensayo se prepara to-  
dos los días inoculando un erlenmeyer de 250 ml que contie-  
20 ne 50 ml de caldo nutritivo (Difco) más 0,2 % de extracto de  
levadura (Difco) con una muestra tomada rascando el tubo in-  
clinado. El matraz se incuba a 37°C en una máquina sacudido-  
ra durante 18-24 horas. A continuación el cultivo de caldo  
se ajusta hasta una transmitancia de 40 % a una longitud de  
25 onda de 660 mμ, utilizando un Spectronic 20 de Bausch &

14 SEP 1958



1 Lomb, mediante la adición de 0,2 % de solución de extracto de levadura al cultivo. El caldo sin inocular se utiliza como blanco para esta determinación. Se emplean 30 ml de caldo ajustado para inocular un litro de medio.

5 Como medio de ensayo se emplea agar nutritivo (Difco) más 0,2 % de extracto de levadura (Difco). Este medio se prepara, se esteriliza en autoclave y se deja enfriar a 50°C. Después de haber inoculado el medio, se añaden 10 ml a placas petri estériles y se deja solidificar el medio.

10 La actividad se expresa en unidades, definiéndose una unidad como la concentración de Antibiótico 833A por ml que sobre un disco de papel de 1/2" (12,7 mm) produce una zona con un diámetro de 28 mm. Para la preparación de la curva patrón se emplean cuatro concentraciones de 833A, a saber, 0,3, 0,4, 0,6 y 0,8 unidades por ml; cada concentración se obtiene por dilución en tampón de tri-(hidroximetil)aminometano ajustado a pH 8,0. Se colocan cuatro discos en cada una de las cinco placas para la preparación de la curva patrón, conteniendo cada placa un disco de cada una de las cuatro concentraciones de antibiótico citadas antes. Las placas se incuban durante 18 horas a 37°C y se miden los diámetros de las zonas de inhibición en milímetros. Se calcula un diámetro de zona medio para cada concentración y con estos valores se construye la curva patrón en papel semi-logarítmico. La pendiente de la línea obtenida está

15

20

25

14



1 comprendida entre 4 y 5.

5 Las muestras de Antibiótico 833A que se van a ensayar se diluyen con tampón 0,05 M a pH 8,0 hasta una concentración apropiada. Los discos se sumergen en la solución de ensayo y se colocan sobre la superficie de la placa de ensayo; normalmente se colocan dos discos por cada muestra sobre una placa de ensayo, uno enfrente de otro. Sobre la placa se colocan dos discos sumergidos en una solución de Antibiótico 833A que contiene 0,4 unidades por ml, en posiciones alternativas con respecto a la muestra. Las placas se incuban a 37°C durante 18 horas y se determinan los diámetros de las zonas en milímetros. La potencia de la muestra se determina mediante un nomograma o a partir de la curva patrón.

15 Cuando se emplea el procedimiento de ensayo modificado utilizando Proteus vulgaris como organismo de ensayo, se utilizan 5 ml de medio inoculado en la placa petri y el antibiótico que se va a analizar se coloca en un disco de papel de 1/2" (12,7 mm). La placa con los discos de ensayo se incuba después durante 18 horas a 37°C y se miden las zonas de inhibición. La potencia se expresa como cantidad de sólido por mililitro que produce una zona de inhibición de 25 mm en estas condiciones.

25 El Antibiótico 833A se produce durante la fermentación aerobia de medios nutritivos acuosos adecuados, en con



1           diciones controladas, por las variedades productoras de  
Antibiótico 833A de S. fradiae. Para la producción de An-  
tibiótico 833A son adecuados los medios acuosos, como los  
5           empleados para la producción de otros antibióticos. Estos  
medios contienen fuentes de carbono y nitrógeno asimilables  
por el microorganismo y sales inorgánicas. Además, los me-  
dios de fermentación contienen trazas de metales necesari-  
os para el crecimiento del microorganismo que generalmen-  
te son suministrados como impurezas como consecuencia de la  
10          adición de otros constituyentes del medio. La cantidad exac-  
ta de la fuente o fuentes de hidratos de carbono utiliza-  
dos en el medio dependerá en parte de los restantes ingre-  
dientes del mismo, pero se ha encontrado que generalmente  
es satisfactoria una cantidad de hidratos de carbono com-  
15          prendida aproximadamente entre 1 % y 6 % del peso del me-  
dio. Estas fuentes de hidratos de carbono pueden ser uti-  
lizadas individualmente o bien pueden combinarse en el me-  
dio varias fuentes de este tipo. Las fuentes de nitrógeno  
adecuadas comprenden millares de materiales proteínáceos  
20          tales como varias formas de hidrolizados de caseína, hari-  
na de soja, licor de infusión de maíz, solubles destilados,  
hidrolizados de levadura, pasta de tomate y similares. Las  
diversas fuentes de nitrógeno, ya sean solas o en combina-  
ción, se utilizan en cantidades que oscilan aproximadamen-  
25          te entre 0,2 y 6 % del peso del medio acuoso.

14 SEP



1 La fermentación utilizando microorganismos produc-  
tores de Antibiótico 833A puede llevarse a cabo a tempe-  
raturas comprendidas entre unos 25° y 31° C. Para obtener  
resultados óptimos, lo más conveniente es realizar estas  
5 fermentaciones a temperaturas de 26° a 30° C. El pH de los  
medios nutritivos adecuados para el cultivo de Streptomy-  
ces fradiae y la producción de Antibiótico 833A puede va-  
riar entre 5,5 y 7,5 aproximadamente.

10 El Antibiótico 833A y sus sales son agentes antimicrobianos útiles que son activos en la inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas. El antibiótico puede ser utilizado como agente antiséptico para eliminar los microorganismos susceptibles del equipo farmacéutico, dental y médico. Además, es útil  
15 en la separación de ciertos microorganismos de las mezclas de microorganismos. El antibiótico puede ser utilizado para tratar los ratones de laboratorio infectados con diversos organismos Gram-negativos y con ello eliminar las fuentes de infección que de otro modo harían que los animales  
20 no fueran adecuados para las pruebas de laboratorio. Como el antibiótico y sus sales son muy activos en la inhibición del crecimiento de varias especies de Salmonella, puede ser utilizado como desinfectante en el lavado de huevos y de zonas sometidas a la infección por Salmonella.

25 Los siguientes ejemplos ilustran los métodos para



1 producir y recuperar el Antibiótico 833A.

EJEMPLO 1

5 Se ajustan a pH 7 100 galones (378,5 litros) de  
caldo filtrado y se pasan a través de una columna que con-  
tiene una resina cambiadora de anión fuertemente básica  
del tipo de amonio cuaternario, con matriz de estireno-di-  
vinilbenceno (Dowex 1 x 2). El adsorbato en resina resul-  
tante se eluye con una solución al 3 % de cloruro amónico  
en metanol al 90 % y el eluato se recoge en fracciones de  
10 2 galones (7,57 litros). Las fracciones 4, 5 y 6, que con-  
tienen la mayor parte del Antibiótico 833A, dan el siguien-  
te análisis:

<u>Fracción nº</u>	<u>Sólidos totales</u>	<u>Análisis</u>	<u>Potencia</u>
4	15,1 mg/ml	14 unidades/ml	0,93 unidades/mg
5	21,7 mg/ml	14 unidades/ml	0,65 unidades/mg
6	36,2 mg/ml	4 unidades/ml	0,11 unidades/mg

15 Las fracciones 4 y 5 se concentran por separado a  
presión reducida para eliminar el metanol hasta una concen-  
tración de unos 200 mg/ml de sólidos totales. Se pasan  
20 275 ml del concentrado de la fracción 5, conteniendo en to-  
tal alrededor de 51 g de sólidos, a través de 8,9 litros  
de gel esférico de poliacrilamida de 50-100 mallas que per-  
mite el fraccionamiento, desalinificación y concentración  
25 de las sustancias con pesos moleculares comprendidos entre  
200 y 2000 (existente en el mercado con el nombre de Bio-



1           Gel P-2 de los Bio-Rad Laboratories, Richmond, California).  
 El adsorbato en gel resultante se desarrolla con agua a  
 razón de 50 ml por minuto mientras se mide el eluato con  
 un refractómetro. El eluato se recupera en fracciones, se  
 5           analiza y se combinan las fracciones activas apropiadas.  
 Se encuentra que los 630 ml de eluato entre 5600 ml y  
 6230 ml contienen 19,1 mg/ml de los sólidos totales y tie  
 nen una actividad de 68 unidades/ml cuando se analizan por  
 el procedimiento de ensayo antes descrito del disco de  
 10           Proteus vulgaris. Esto representa que el Antibiótico 833A  
 tiene una potencia de 3,6 unidades/mg.

          Se realizan cuatro cromatogramas adicionales de la  
 misma forma utilizando, respectivamente, una porción de  
 275 ml y otra de 287 ml del concentrado de la fracción 5 y  
 15           dos porciones de 285 ml del concentrado de la fracción 4.  
 Las fracciones ricas de los cinco cromatogramas se reúnen  
 y se concentran a presión reducida hasta unos 100 mg/ml.  
 Los 660 ml del concentrado resultante tienen una potencia  
 de 4,1 unidades/mg.

20           Se pasan 100 ml de este concentrado a través de una  
 columna que contiene 2480 ml de resina cambiadora de ca-  
 tión fuertemente ácida del tipo de sulfonato con una ma-  
 triz de estireno-divinilbenceno (vendida por Dow Chemical  
 Company con el nombre comercial de Dowcx 50 x 2), en su  
 25           forma hidrógeno. El adsorbato en resina resultante se dese



1 rrolla con agua a razón de 19 ml por minuto y se recogen  
fracciones de 20,5 ml del eluato resultante, analizándose  
éste mediante un refractómetro registrador. Las fracciones  
45-65 se valoran independientemente hasta pH 7 con hidró-  
5 xido sódico 0,1 N. A continuación se analizan las frac-  
ciones 52-62 y se reúnen para obtener una solución acuosa  
de Antibiótico 833A.

De la misma forma se cromatografían cinco porciones  
adicionales de 100 ml del concentrado sobre la resina cam-  
10 biadora de catión fuertemente ácida, y las fracciones más  
activas de los eluatos de resina resultantes se combinan  
con las fracciones 52-62 para obtener un total de 1870 ml.  
Esta solución acuosa de Antibiótico 833A tiene un pH de  
6,8, un contenido total en sólidos de 2,9 mg/ml y una ac-  
15 tividad de 70 unidades/ml. Por lo tanto, la potencia de  
la sal sódica del Antibiótico 833A en esta solución acuo-  
sa es de 24 unidades/mg. La solución acuosa se concentra  
después a presión reducida y se seca por congelación para  
obtener 4,7 g del producto.

20 El caldo de fermentación utilizado como material  
de partida en el procedimiento anterior se prepara de la  
siguiente forma:

Se utiliza un cultivo liofilizado de Streptomyces  
graciae MA-2898 (AFCC 21096) (NRRL B-3357) para inocular  
25 50 ml de medio esterilizado de la siguiente composición:



	<u>g/litro</u>
1	Extracto de levadura 10
	Glucosa 10
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,05
5	Tampón de fosfato # 2 ml
	Agua destilada c.s. el resto

# 91 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 95,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> llevados a 1 litro con agua destilada.

10 El matraz inoculado se coloca después en un sacudidor rotatorio a 220 rpm con un recorrido de 2" (50,8 mm) y se incuba durante 48 horas a 28°C.

15 Entonces se utiliza un inoculum de 10 ml del caldo vegetativo resultante para inocular un erlemeyer de 2 litros provisto de tabique que contiene 500 ml de medio esterilizado de composición igual a la dada anteriormente. El matraz inoculado se coloca después en un sacudidor rotatorio a 220 rpm y se incuba durante 48 horas a 28°C.

20 El caldo de fermentación resultante se emplea para inocular un fermentador de acero inoxidable de 50 galones (189,3 litros) que contiene 160 litros de medio estéril de la misma composición que antes. El medio inoculado se incuba a 28°C con agitación, mientras se mantiene un caudal de aire de 3 cfm (84 litros/minuto) a través del caldo de fermentación. Durante el periodo de fermentación, se añe-



34

1 den pequeñas cantidades de Polyglycol .2000 para controlar  
la formación de espuma de la mezcla.

A continuación se emplea un inoculum de 25 litros  
del caldo de fermentación resultante para inocular un fer-  
mentador de acero inoxidable de 200 galones (757,1 litros)  
5 que contiene 510 litros de medio estéril de la siguiente  
composición:

	<u>g/litro</u>
Avena preparada para alimento	20
10 Solubles de destilería	10
Harina de soja	20
Citrato sódico	2
Ascorbato sódico	0,5
Agua destilada c.s.	el resto

15 El pH de este medio se ajusta a 6,5 antes de la es-  
terilización. El caldo inoculado se incuba entonces a una  
temperatura de 28<sup>o</sup>C con agitación, mientras se mantiene un  
caudal de aire de 10 cfm (283 litros/mainuto) durante 3  
días. Durante la fermentación se añade en pequeñas cantida-  
des Polyglycol 2000 como agente antiespumante para impedir  
20 la excesiva formación de espuma en el caldo de fermenta-  
ción. A continuación se filtra este último empleando tierra  
de diatomáceas. El caldo filtrado tiene un pH de 7,9 y con-  
tiene 13,4 mg/ml de sólidos totales. El análisis del caldo  
25 filtrado por el procedimiento de ensayo del disco-placa



1 con Proteus vulgaris indica que contiene 0,8 unidades/ml de Antibiótico 833A, correspondiente a una actividad de los sólidos del caldo de 0,06 unidades/mg.

EJEMPLO 2

5 Se ajustan a pH 7,0, 5,6 litros de caldo de fermentación filtrado, con una zona de inhibición de 26 mm cuando se analiza frente a Proteus vulgaris como organismo de ensayo utilizando discos de 14 mm, y se pasa a través de una columna que contiene 100 ml de una resina cambiadora  
10 de anión fuertemente básica compuesta por grupos cambiadores de amonio cuaternario unidos a una red polimérica de estireno-divinilbenceno (Dowex 1 x 2) en el ciclo de cloruro, a razón de .10 ml por minuto. El caldo gastado resultante no posee actividad antibiótica cuando se analiza con  
15 Proteus vulgaris en la forma antes descrita.

El adsorbato en resina resultante se lava con unos 100 ml de agua y después se eluye con una solución al 3 % de cloruro amónico en metanol al 90 %. El eluato se recoge en fracciones de 50 ml, que presentan las siguientes ac  
20 tividades por el procedimiento de ensayo normalizado antes descrito con Proteus vulgaris:

- 1. Actividad nula
- 2. Zona de 26 mm
- 3. Zona de 28 mm a dilución de 1:25
- 25 4. Zona de 26 mm a dilución de 1:100



- 1                   5. Zona de 35 mm
- 6. Zona de 22 mm
- 7. Zona de 18 mm

8-10. Actividades nulas

5                   La fracción número 4, que contiene la mayor parte del antibiótico, se concentra a vacío para separar el metanol y después se diluye con agua hasta 50 ml. La solución acuosa de Antibiótico 833A así obtenida tiene un pH de 5,6, un total de sólidos de 37 mg/ml y da una zona de 25,5 mm a una dilución de 1:100 cuando se analiza con Proteus vulgaris en la forma antes descrita.

El caldo de fermentación utilizado como material de partida en el procedimiento anterior se prepara de la siguiente forma:

15                   a.

Sobre 10 ml de medio estéril AO de la siguiente composición:

	<u>g/litro</u>
Extracto de buey	3
20           Hidrolizado de caseína	10,6
Dextrosa	10
Cloruro sódico	5
Agua destilada c.s.	el resto

25                   y con un pH de 7,2 antes de la esterilización se agrega un cultivo inclinado de agar de Streptomyces fradiae



1 MB-2898 (NRRL B-3351) (ATCC 21096) sobre medio de ágar  
FA de la siguiente composición:

	<u>g/litro</u>
Agar	20
5 Extracto de levadura	10
Glucosa	10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05
Tempón de fosfato <sup>¶</sup>	2 ml
Agua destilada c.s.	el resto

10

<sup>¶</sup> 91 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 95 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> llevados hasta 1 litro con agua destilada.

Un erlenmeyer de 250 ml con tabique, conteniendo 50 ml de medio estéril A0, se inocula con 3 ml de esta suspensión celular. A continuación los matraces se agitan en un sacudidor rotatorio a 220 rpm, con un recorrido de 2" (50,8 mm), a 28°C durante 72 horas. El inóculo resultante se usa después para sembrar cada erlenmeyer de 2 litros con tabique de una serie, conteniendo 350 ml de medio estéril FD, utilizándose para cada matraz 10,5 ml de cultivo vegetativo. Los matraces inoculados se incuban después durante 96 horas en un sacudidor rotatorio a 145 rpm con un recorrido de 2" (50,4 mm). Después se combina el contenido de 10 matraces.

25

El caldo de fermentación así obtenido, con un pH de

14 SEP



1 6,6, se filtra empleando tierra de diatomáceas. El caldo filtrado da una zona de actividad de 26 mm cuando se analiza con Proteus vulgaris en la zona antes descrita.

b.

5 Se utiliza un cultivo liofilizado de Streptomyces MB-2898 (NRRL B-3357) (ATCC 21096) para inocular 50 ml de medio estéril FA formado por los siguientes ingredientes:

		<u>g/litro</u>
10	Extracto de levadura	10
	Glucosa	10
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05
	Tampón de fosfato #	2 ml
	Agua destilada c.s.	el resto

15

# 91 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 95,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> llevados hasta 1 litro con agua destilada.

El matraz inoculado se coloca después en un sacudidor rotatorio a 220 rpm con un recorrido de 2" (50,8 mm) y se incuba durante 48 horas a 28°C y el caldo de fermentación resultante se utiliza para inocular un tanque de siembra de segunda etapa conteniendo 50 ml del mismo medio en un erlenmeyer de 250 ml con tabique, utilizando un inoculum al 2 %. Los matraces de siembra de segunda etapa se agitan también en el sacudidor rotatorio a 28°C durante

20

25



14 SEP 1968

1 dos días.

Después se emplea un inoculum de 10,5 ml de este cultivo vegetativo para inocular un erlenmeyer de 2 litros con tabique, conteniendo 350 ml de medio esterilizado formado por los siguientes ingredientes:

	<u>g/litro</u>
Harina de avena seca	20
Pasta de tomate	20
Agua destilada c.s.	el resto

10 Estos matraces de 2 litros se incuban en un sacudidor rotatorio a 145 rpm con un recorrido de 2" (50,8 mm) durante 72 horas a 28°C. Al final del periodo de incubación, se combina el contenido de diez de estos matraces y se filtra con tierra de diatomáceas para separar el micelio. El caldo de fermentación filtrado resultante da una zona de inhibición de 29 mm cuando se analiza frente a Proteus vulgaris MB-838 por el procedimiento antes descrito.

15 Se combinan 2,6 litros del caldo de fermentación filtrado procedente de (a) y 3 litros del caldo de fermentación filtrado de (b) y se utilizan como material de partida en el procedimiento anterior.

### EJEMPLO 3

20 Se combinan las fracciones 3 y 5 del eluato de resina preparado en la forma descrita en el Ejemplo 2 y se



1 concentra a vacío hasta 50 ml con un pH de 5,4, un contenido total en sólidos de 72 mg/ml y dando una zona de 27 mm a una dilución de 1:40 con agua cuando se ensaya siguiendo el método con Proteus vulgaris.

5 Se cromatografían 5 ml de esta solución acuosa de Antibiótico 833A sobre 35 g de gel esférico de poliacrilamida de 100-200 mallas, con un intervalo de operación de 200-2000 (Bio-Gel P-2). El adsorbato en gel se desarrolla después con agua destilada a razón de 25 ml por hora y se recogen fracciones de eluato de 4,6 ml. Las fracciones núms. 17-21 presentan actividad de Antibiótico 833A cuando se analizan por el método de ensayo en disco con Proteus vulgaris y presentan una pureza de 3 a 5 veces mayor que la pureza del material de partida.

10

15 Durante la elución con agua destilada, la columna se examina con un refractómetro registrador diferencial y en las fracciones 21-24 se encuentra sal con un  $K_m$  de 1,88. El  $K_m$  de las fracciones activas de antibiótico es de 1,56.

20

#### EJEMPLO 4

Se emplean 500 ml de un cultivo vegetativo de Streptomyces fradise MA-2898 (ATCC 21096) (NRRL B-3357) preparado cultivando el microorganismo con un erlenmeyer de 2 litros con tabique siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, para inocular un fermentador de acero inoxidable.

25

14 SEP



1 dable de 200 galones (757,1 litros) conteniendo 467 litros de medio estéril de la siguiente composición:

	<u>g/litro</u>
Extracto de levadura	10
5 Glucosa	10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05
Tampón de fosfato *	2 ml
Agua destilada c.s.	el resto

10 \* 91 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 95,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> llevados hasta 1 litro con agua destilada.

El medio inoculado se incubó a 28° durante 24 horas con agitación mecánica, mientras se mantiene un caudal de aire de 10 cfm (283 l/min.) a través del medio de fermentación, añadiendo una pequeña cantidad de Polyglycol 2000 para controlar la formación de espuma. Se emplean 215 litros del caldo de fermentación resultante para inocular un fermentador de acero inoxidable de 1500 galones (5678 litros) conteniendo 1200 galones (4542, 5 litros) de medio nutritivo estéril de la siguiente composición:

	<u>g/litro</u>
Avena preparada para alimento	20
Solubles de destilería	10
Harina de soja	20
25 Citrato sódico	2

74 SEP 1968

1

g/litro

Ascorbato sódico

0,5

Agua destilada c.s.

el resto

5

ajustándose el pH del medio a 6,5 antes de la esterilización.

10

El caldo inoculado se incuba a una temperatura de 28°C con agitación, mientras se mantiene un caudal de aire de 55 cfm (1557 litros/minuto) durante 2 días, añadiendo pequeñas cantidades de Polyglycol 2000 para controlar la formación de espuma.

15

El caldo de fermentación resultante se filtra empleando tierra de diatomáceas. Se pasan 550 galones (2082 litros) del caldo filtrado, con una actividad de 0,34 unidades/ml, a través de una columna de resina cambiadora de anión, previamente usada, del tipo de amonio cuaternario en una matriz de estireno-divinilbenceno (Dowex 1 x 2) en el ciclo de cloruro. El adsorbato en resina resultante se eluye con una solución acuosa al 3 % de cloruro sódico y el eluato resultante se recoge en fracciones de 5 galones (18,9 litros). El caldo gastado, después de pasar por la columna, es inactivo en el ensayo con Proteus vulgaris. Se combinan las fracciones 5-12 que contienen la mayor parte de la actividad de antibiótico.

20

EJEMPLO 5

25

Se utiliza un cultivo liofilizado de Streptomyces



14 SEP

1 fradiae MA-2913 (ATCC 21099) (NRRL B-3360) para inocular  
50 ml de medio estéril de la siguiente composición, en  
un erlenmeyer de 250 ml con tabique:

	<u>g/litro</u>
5           Harina de avena molida	10
Hidrolizado de levadura	10
Tampón de fosfato #	2 ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05
Agua destilada c.s.	el resto

10

-----  
# 91 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 95,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> llevados hasta 1  
litro con agua destilada.

15

El matraz inoculado se incuba después durante 24  
horas a 28°C en un sacudidor rotatorio. Se emplean 10 ml  
del caldo de fermentación resultante para inocular un  
segundo erlenmeyer con tabique de 250 ml, conteniendo 50  
ml del mismo medio estéril. El caldo inoculado resultante  
se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio durante 24 ho-  
ras. El caldo de fermentación resultante se usa para ino-  
cular un fermentador de 5 litros conteniendo 2600 ml de  
medio nutritivo estéril de la siguiente composición:

	<u>g/litro</u>
20           Avena cortada con acero	30
Licor de infusión de maíz	10
25           Harina de soja	10



14 SEP 1968

1

g/litro

Agua c.s.

el resto

El pH se ajusta a 6,6 antes de la esterilización.

5 El caldo nutritivo inoculado se incuba después a 28°C durante 4 días mientras se agita y airea el caldo de fermentación con 3 litros de aire por minuto.

10 A continuación se filtra el caldo de fermentación resultante para obtener 2350 ml de caldo con un pH de 9,0 y una actividad de 3,8 unidades/ml determinada por el procedimiento de ensayo en disco con Proteus vulgaris.  
Se pasan 750 ml del caldo de fermentación a través de una columna que contiene 50 ml de una resina cambiadora de anión fuertemente básica del tipo de amonio cuaternario (Dowex 1 x 2) en el ciclo de cloruro. El caldo gasta-  
15 do de la columna contiene solamente una pequeña cantidad de Antibiótico 833A. El adsorbato en resina resultante se eluye con una solución al 1 % de cloruro sódico en agua y se recogen fracciones de 50 ml del eluato resultante. Los seis primeros eluatos contienen las siguientes canti-  
20 dades de actividad antibiótica:

1. 5 %

2. 35 %

3. 28 %

4. 10 %

25

5. 6 %

14 SEP 1968



1 6. 2 %

EJEMPLO 6

5 Se prepara una columna de 84,5 cm x 1,4 cm de resina cambiadora de anión fuertemente básica, compuesta de grupos cambiadores de amonio cuaternario unidos a una red polimérica de estireno-divinilbenceno (Dowex 1 x 2) en el ciclo de cloruro (50-100 mallas). La resina se lava con 725 ml de cloruro sódico 0,1 M para equilibrar la misma. Se disuelven 36 mg de la sal sódica cruda de Antibiótico 833A de 27  $\mu$ /mg preparada por el procedimiento descrito en el ejemplo 1, en 1 ml de cloruro sódico 0,1 M a razón de 1 ml/minuto, recogiendo fracciones de 5 ml. La corriente efluente se examina utilizando un refractómetro Mecco-Matic Modelo 2. Cada quinta fracción se analiza frente a Proteus vulgaris MB-838 para localizar la zona general de bioactividad. Se observan dos máximos bioactivos: fracciones 180 a 268 llamadas Fracción A-1 y 420 a 560 llamadas Fracción A-2. Se combinan las fracciones de cada máximo y se concentran hasta 10 ml.

20 Cada concentrado se filtra a través de gel de poli acrilamida (Bio-Gel P-2) (150 cm x 1,5 cm) para separar el antibiótico del cloruro sódico. El efluente se examina con el refractómetro Mecco-Matic Modelo 2. Las fracciones se analizan frente a Proteus vulgaris MB-838 para localizar la bioactividad. Se reúne la bioactividad en-



14 SEP 1964



1       parar el antibiótico del tampón. El efluente se examina  
con un refractómetro Mecco-Matic Modelo 2. Las fraccio-  
nes se analizan frente a Proteus vulgaris MB-838 para  
5       localizar la bioactividad. Se reúne la bioactividad en  
la fracción comprendida entre 1420 ml y 1680 ml, se con-  
centra y se seca por congelación. El residuo resultante  
constituído por 89,6 mg da 46  $\mu$ /mg.

Este Antibiótico 833A impuro se disuelve en 5 ml  
de agua y la solución se pasa a través de una columna que  
10       contiene 2 ml de resina cambiadora de catión fuertemente  
ácida, compuesta por grupos cambiadores de ácido sulfóni-  
co nuclear unidos a una red polimérica de estireno-divinil  
benceno (Dowex 50) en el ciclo de sodio, para sustituir  
por sodio el grupo tri-(hidroximetil)aminometano. La sal  
15       sódica de Antibiótico 833A en los 10 ml de efluente tie-  
ne una actividad de 480 unidades/ml. La solución se seca  
por congelación dando 71,6 mg de sólido con una potencia  
de 67 unidades/mg.

#### EJEMPLO 8

20       Se bombean 1500 ml de caldo de fermentación filtra-  
do, remesas núms. 15733 y 15734, con una actividad de  
0,1 unidades/ml y una zona de innibición de 21,5 mm cuan-  
do se analiza frente a Proteus vulgaris MB-838 utilizan-  
do discos de 14 mm y con un pH de 6,1, sobre 100 ml de  
25       resina cambiadora de ión acrílica reticulada, débilmente



1 básica (IRA-68) en el ciclo de base libre, a razón de  
 7 ml/minuto. El caldo gastado no tiene actividad anti-  
 biótica cuando se analiza frente a Proteus vulgaris. La  
 5 columna se lava con agua y se eluye con solución acuosa  
 de cloruro sódico al 1 %. Se recogen fracciones de 10 ml  
 después de haber recogido un frente de 30 ml que se des-  
 precia. Se analizan las fracciones y se encuentra que las  
 10 11-30 contienen el 93 % de la actividad introducida en  
 la columna. Las fracciones activas 11-30 se combinan dan-  
 do 192 ml de solución con un pH de 9,5. Se ajusta el pH  
 a 7 y la solución se analiza frente a Proteus vulgaris  
 MB-838. Los resultados del análisis son los siguientes:

<u>Dilución</u>	<u>Zona de inhibición</u>
1. Sin diluir	32,5 mm
2. 1:2	29 mm
3. 1:4	24,5 mm
4. 1:8	20,5 mm

El caldo de fermentación utilizado en el ejemplo  
 anterior se prepara siguiendo el procedimiento de prepara-  
 20 ción del caldo del Ejemplo 1.

25



14 SEP 1961

1

## REIVINDICACIONES

5

10

1. Un procedimiento de recuperacion y purificacion de un antibiótico particularmente del Antibiótico 833A a partir de soluciones acuosas impuras que contienen dicho antibiótico, cuyo procedimiento consiste en pasar un caldo de fermentación o una solución que contenga dicho antibiótico a través de una columna de una resina cambiadora de ión seleccionada entre el grupo formado por resinas cambiadoras de anión y resinas cambiadoras de catión fuertemente ácidas, eluir el adsorbato en resina con un disolvente de elución, recoger los eluatos y combinar las fracciones activas.

15

2. Un procedimiento según la reivindicacion 1, en el que la resina cambiadora de anión está constituida por grupos cambiadores de amonio cuaternario unidos a una red polimérica de estireno-divinilbenceno.

20

3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la resina cambiadora de catión está constituida por grupos cambiadores de acido sulfónico nuclear unidos a una red polimérica de estireno-divinilbenceno.

25

4. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el disolvente de elución es una solución hidroalcohólica de una sal en la que la sal está seleccionada entre el grupo formado por sales solubles en agua de metales alcalinos, sales amónicas y sales de tri-(hidroximetil)amino-metano.



1           5. Un procedimiento según la reivindicación 1, en  
el que el disolvente de elución es una solución al 3% de  
cloruro amónico en metanol al 90 %.

5           6. Un procedimiento según la reivindicación 1, en  
el que el disolvente de elución es una solución acuosa -  
al 1-3% de cloruro sódico.

10           7. Un procedimiento según la reivindicación 1, que  
además comprende la combinación de las fracciones activas,  
la concentración de las fracciones combinadas, la disolu-  
ción del residuo en agua, la cromatografía de la solución  
acuosa sobre gel de poliacrilamida con un intervalo de --  
operación de 200-2000 y el desarrollo con agua del absor-  
bato en gel.

15           8. Un procedimiento según la reivindicación 1 para  
la recuperación y purificación de un antibiótico particu-  
larmente del Antibiótico 833A en el que la columna de resi-  
na cambiadora de anión se lava con una solución salina en  
la que la sal está seleccionada entre el grupo formado por  
sales de metal alcalino, de metal alcalino-térreo, de amo-  
nio y de tri-(hidroximetil)aminometano y sales de bases --  
orgánicas, con objeto de equilibrar la resina, la sal impu-  
ra del antibiótico se desarrolla en la solución equilibra-  
dora, se pasa la solución a través de la resina, se desa--  
rolla la columna con dicha solución equilibradora, se combi-  
25           nan las fracciones activas y se concentran las fracciones combinadas.



14 SEP

1                   9. Un procedimiento según la Reivindicación 8,  
que además comprende la filtración del concentrado a  
través de una resina de filtración en forma de gel pa-  
ra separar la sal, la combinación de las fracciones ac-  
5                   tivas, la concentración de las fracciones combinadas y  
la separación del disolvente del concentrado.

10                   10. Se reivindica por último como objeto sobre  
el que ha de recaer la Patente de Invención que se soli-  
cita: "UN PROCEDIMIENTO DE RECUPERACION Y PURIFICACION DE  
UN ANTIBIOTICO".

Todo conforme queda descrito y reivindicado en  
la presente memoria descriptiva que consta de treinta y  
cinco páginas mecanografiadas.

15                   Madrid, 14 setiembre 1.968

BERNARDO UNGRIA

P.P.

20

25