

SECCION TECNICA  
CLASIFICACION I. P. C.  
C. F. C-12  
SUBCLASE D



375244

NUMERO 375.244

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., INC.

Residencia: 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New  
Jersey, U.S.A.

Enunciado: "PERFECCIONAMIENTOS INTRODUCIDOS EN  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION  
DE ACIDO (-) (CIS-1,2-EPOXIPROPIL)  
FOSFONICO".

Prioridad: de la solicitud de patente estadouni-  
dense n.º. 791.172 del 14 de enero 1969.





1 del microorganismo, que habitualmente son proporcionados como impurezas accidentales de los restantes constituyentes del medio. En general, los hidratos de carbono como azúcares, por ejemplo dextrano, maltosa, galactosa, glucosa y similares y almidones como granos, 5 por ejemplo avena y centeno, almidón de maíz, harina de maíz y similares, pueden ser utilizados solos o en combinación como fuentes de carbono asimilable en el medio nutritivo. La cantidad exacta de la fuente o fuentes 10 de hidratos de carbono utilizada en el medio dependerá en parte de los otros ingredientes del mismo. No obstante, se ha encontrado que es suficiente una cantidad de hidrato de carbono comprendida aproximadamente entre 1 y 6 % del peso del medio. Puede emplearse una sola fuente 15 de carbono o varias fuentes de carbono combinadas en el medio.

Las fuentes de nitrógeno satisfactorias pueden ser miles de materias proteínáceas, por ejemplo varias formas de hidrolizados de caseína, harina de soja, licor 20 de infusión de maíz, solubles de destilería, hidrolizados de levadura, pasta de tomate y similares.

Las diversas fuentes de nitrógeno pueden ser utilizadas solas o en combinación y se emplean en cantidades que oscilan entre 0,2 y 6 % del peso del medio acuoso. 25

375244



1970

1 El ácido (-)(cis-1,2-epoxipropil)fosfónico se for  
ma cultivando, en condiciones controladas, variedades de  
microorganismos como, por ejemplo, las variedades del gé  
nero Streptomyces que producen el antibiótico. Uno de  
5. estos microorganismos, que ha sido aislado del suelo, ha  
sido denominado MA-2898 en la colección de cultivos de  
Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey; los sub-aislados  
del cultivo madre han sido denominados MA-2911, MA-2912  
y MA-2913. Estos cultivos se han colocado en depósito  
10 permanente en la colección de cultivos del Northern Uti-  
lization Research & Development Branch del Departamento  
de Agricultura de Estados Unidos en Peoria, Illinois y  
les han sido atribuidos los números de cultivo NRRL  
B-3357, NRRL B-3358, NRRL B-3359 y NRRL B-3360, respec-  
tivamente. Estos microorganismos han sido clasificados  
15 en la especie Streptomyces fradiae.

El antibiótico es también producido cultivando en  
condiciones controladas, otras variedades de Streptomyces  
también aisladas del suelo e identificadas en la colec-  
20 ción de cultivos de la Merck & Co., Inc. como cultivos  
MA-2867, MA-2903, MA-2916, MA-2917, MA-3270, MA-3272 y  
MA-3267. Estos cultivos han sido clasificados como miem-  
bros de la especie Streptomyces viridochromogenes. Los  
cultivos MA-2903, MA-2867, MA-2917 y MA-3270 han sido co-  
25 locados en depósito permanente en la colección de culti-



1970

1 vos de Northern Utilization Research and Development  
Division del Departamento de Agricultura de Estados Uni-  
dos y les han sido atribuidos los números de cultivo  
NRRL-3413, NRRL-3414, NRRL-3415, NRRL-3416 y NRRL-3427,  
5 respectivamente.

El cultivo MA-3269 ha sido atribuido a la espe-  
cie Streptomyces wedmorensis y se le ha asignado un nú-  
mero NRRL 3426.

10 Además de las especies anteriores de microorga-  
nismos, también se considera el uso de otros microorganis-  
mos incluídas las variedades de Streptomyces aisladas de  
la naturaleza u obtenidas por mutación de estos organis-  
mos, como las obtenidas por selección natural o las pro-  
ducidas por agentes mutantes, por ejemplo irradiación con  
15 rayos X, irradiación ultravioleta, mostazas nitrogenadas  
y similares.

Debido a la dificultad inherente en la separación  
de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico puro de las  
grandes cantidades de impurezas del caldo de fermentación,  
20 es de gran importancia encontrar un método de aumentar la  
concentración del antibiótico con respecto a los sólidos  
totales del caldo.

25 Se ha descubierto que la adición de citrato a los  
medios de fermentación orgánicos complejos y químicamen-  
te definidos aumentan la producción de ácido (-) (cis-

375244



1970

1 1,2-epoxipropil)fosfónico. Por "medios orgánicos comple-  
jos" se entienden aquellos medios en que algunos de los in-  
gredientes no están químicamente definidos. Un ejemplo  
de estos medios es el constituido por avena molida, ha-  
5 rina de soja, ascorbato sódico y solubles de destilería.  
Por "medios químicamente definidos" se entienden aque-  
llos medios en los que todos los ingredientes están de-  
finidos químicamente. Un ejemplo de estos medios es el  
constituido por almidón de maíz, fosfato ácido potásico,  
10 ascorbato sódico, asparragina, metionina, glutamato mo-  
nosódico, cloruro cálcico, sulfato magnésico y sulfato  
ferroso. La cantidad de citrato necesaria para estimu-  
lar la producción del antibiótico varía con el medio em-  
pleado. La concentración real de citrato empleada en una  
15 formulación dada de un medio varía con el microorganismo  
particular empleado y las condiciones de fermentación uti-  
lizadas. Se ha observado una mayor producción del antibió-  
tico en los medios que contienen alrededor de 4 a 8 gra-  
mos por litro de la fuente de citrato, cuando se agrega  
20 como citrato sódico. En general, se ha encontrado que la  
adición de unos 0,50 g/litro a unos 8,0 g/litro de la  
fuente de citrato aumenta la producción del antibiótico.  
La adición de citrato sódico a un medio constituido por  
agentes nutritivos orgánicos complejos, por ejemplo, au-  
25 menta la producción de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-



1970

1            fosfónico hasta en un 95 % cuando el citrato sódico se  
             encuentra presente a concentraciones que oscilan entre  
             1,0 g/litro y 8,0 g/litro aproximadamente. Análogamen-  
5            te, en un medio sintético o químicamente definido, la  
             adición de una fuente de citrato aumenta la producción  
             de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico hasta 6 ó  
             7 veces, por ejemplo, cuando la concentración de citra-  
             to sódico aumenta de 1 a unos 4 g/litro de medio. Por  
10            lo tanto, una concentración de citrato equivalente a  
             0,65-5,2 g/litro de medio aumenta la producción del an-  
             tibiótico.

             Puede emplearse cualquier fuente de citrato que  
             proporcione una concentración adecuada de citrato en el  
             medio de fermentación. De preferencia, el citrato se  
15            agrega en forma de sal inorgánica, tal como citrato só-  
             dico, potásico o cálcico, aunque también se puede em-  
             plear el ácido libre. El citrato también puede ser agre-  
             gado en forma de sal o complejo cítrico natural, como el  
             que puede encontrarse presente en los agentes nutritivos  
20            microbianos que son ricos en ácido cítrico. Los agentes  
             nutritivos habituales comprenden una fuente de carbono  
             asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable, sales  
             inorgánicas y factores del crecimiento cuando éstos son  
             necesarios. También se considera la adición de citrato  
25            a medios de fermentación que contienen otros microorga-



E. 1970

1 nismos capaces de producir ácido (-) (cis-1,2-epoxipro-  
pil)fosfónico. También se puede emplear una fuente de ci-  
trato en combinación con otros estimulantes de la produc-  
5 ción de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico, tales  
como cobalto, glutamato monosódico, una fuente de fósfo-  
ro, metionina y L-cisteína. Los estimulantes de la pro-  
ducción adicionales pueden encontrarse presentes en el  
medio de fermentación como agente nutritivo o como aditi-  
vos. El uso de citrato en combinación con otros estimu-  
lantes para la producción del antibiótico da lugar a un  
10 mayor aumento en dicha producción.

Aunque el nuevo antibiótico de este invento se pue-  
de producir en cultivos de superficie y sumergidos, ac-  
tualmente se prefiere realizar la fermentación en estado  
15 sumergido. Las fermentaciones a pequeña escala se realizan  
convenientemente colocando cantidades adecuadas de me-  
dio nutritivo en matraces, esterilizando los matraces y  
su contenido por calefacción a 120°C, inoculando los ma-  
traces con esporas o con un cultivo celular vegetativo  
de un microorganismo productor de ácido (-) (cis-1,2-epo-  
20 xipropil)fosfónico, por ejemplo una variedad de Strepto-  
myces, tapando sin apretar los cuellos de los matraces  
con algodón y permitiendo que la fermentación transcurra  
en un laboratorio a temperatura constante a unos 28°C,  
25 durante 3 a 5 días. Para el trabajo a mayor escala es



1970

1           preferible realizar la fermentación en tanques adecua-  
dos provistos de un agitador y de medios de aireación  
del medio de fermentación. En este método, el medio nu-  
tritivo se prepara en el tanque y se esteriliza calentan-  
5           do a 120°C. Después de enfriar, el medio esterilizado se  
inocula con una fuente adecuada de cultivo celular vege-  
tativo del microorganismo y se permite que la fermenta-  
ción transcurra durante 2 a 4 días mientras se agita y/o  
se airea el medio nutritivo y se mantiene la temperatura  
10           a unos 28°C. Este método de producción de ácido (-) (cis-  
1,2-epoxipropil)fosfónico es especialmente adecuado para  
la preparación de grandes cantidades del nuevo antibió-  
tico.

15           La fermentación utilizando el microorganismo pro-  
ductor de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico puede  
realizarse a temperaturas que oscilan entre 20°C y 40°C  
aproximadamente. No obstante, para obtener resultados ópti-  
mos, es más conveniente realizar las fermentaciones a tem-  
peraturas comprendidas entre 26°C y 30°C. El pH de los  
20           medios nutritivos adecuados para cultivar el microorganis-  
mo y producir el antibiótico puede variar entre 5,0 y  
9,0 aproximadamente. No obstante, el intervalo preferido  
de pH oscila entre 6,0 y 7,5.

25           En la realización del proceso de fermentación, se  
prepara una suspensión celular mediante la adición de me-  
dio estéril a un cultivo de agar inclinado de un micro-

375244



1970

1 organismo productor de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-  
fosfónico. A continuación se emplea el crecimiento del  
cultivo inclinado para inocular un matraz de siembra y  
este último se agita a unos 28°C durante 1 a 3 días pa-  
5 ra obtener un buen desarrollo. El matraz de siembra es  
utilizado después para inocular los matraces de produc-  
ción. Alternativamente, el matraz de siembra puede ser  
inoculado con un cultivo liofilizado o un inoculum con-  
gelado.

10 En general, la inoculación se realiza empleando  
alrededor de 1 ml por 30 ml de medio de producción con-  
teniendo la concentración deseada de citrato y se permi-  
te que la fermentación transcurra durante 2 a 4 días mien-  
tras se agita y/o airea el medio nutritivo, manteniendo  
15 la temperatura a unos 28°C. Todos los matraces de pro-  
ducción, es decir, los que contienen citrato adicional y  
los matraces empleados como controles, son valorados des-  
pués, generalmente al cabo de 3 ó 4 días, para determi-  
nar la cantidad de antibiótico producida en cada matraz.

20 El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico es va-  
lorado convenientemente mediante un procedimiento de dis-  
co-placa empleando Protens vulgaris MB-838 (ATCC 21100 y  
NRRL B-3361) como organismo de ensayo. El cultivo de en-  
sayo se mantiene como cultivo inclinado en agar nutritivo  
25 (Difco) más 0,2 % de extracto de levadura (Difco). Los



ENE. 1970

1           cultivos inclinados inoculados se incuban a 37°C duran-  
te 18 a 24 horas y se mantienen a las temperaturas del  
refrigerador hasta que son utilizados; todas las semanas  
se preparan cultivos inclinados recientes.

5           El inoculum para las placas de valoración se pre-  
para todos los días inoculando un erlenmeyer de 250 ml  
que contiene 50 ml de caldo nutritivo (Difco) más 0,2 %  
de extracto de levadura (Difco) con una rascadura del  
tubo inclinado. El matraz es incubado en una máquina sa-  
cudidora a 37°C durante 18-24 horas. A continuación el  
10 cultivo del caldo es ajustado al 40 % de transmitancia  
a una longitud de onda de 660 mμ, empleando un aparato  
Bausch & Lomb Spectronic 20 mediante la adición al culti-  
vo de solución al 0,2 % de extracto de levadura.

15           El caldo no inoculado se emplea como patrón para  
esta determinación. Para inocular 1 litro de medio se  
emplean 30 ml del caldo ajustado.

20           Como medio de ensayo se utiliza agar nutritivo  
(Difco) más 0,2 % de extracto de levadura (Difco). Se  
prepara este medio, se esteriliza en autoclave y se de-  
ja enfriar a 50°C. Después de haber inoculado el medio,  
se agregan 10 ml a placas Petri estériles y el medio se  
deja solidificar.

25           La actividad se expresa como unidades, estando de-  
finida una unidad como la concentración del antibiótico



NE. 1970

1 por mililitro que en un disco de papel de 0,5" (12,7 mm)  
produce una zona de 28 mm de diámetro. Se emplean cuatro  
concentraciones del antibiótico para la preparación de  
la curva patrón, a saber 0,3, 0,4, 0,6 y 0,8 unidades  
5 por mililitro, obteniéndose cada concentración mediante  
la dilución en solución reguladora 0,05 M de tri(hidro-  
ximetil)aminometano, ajustada a pH 8,0. Se colocan cua-  
tro discos en cada una de las cinco placas para la prepa-  
ración de la curva patrón, conteniendo cada placa un dis-  
10 co de cada una de las cuatro concentraciones de antibió-  
tico antes indicadas. Las placas se incuban durante 18  
horas a 37°C y se miden los diámetros de las zonas de in-  
hibición en milímetros. Se calcula un diámetro medio de  
zona para cada concentración y a partir de estos valores  
15 se prepara la curva patrón en papel semilogarítmico. La  
pendiente de la línea obtenida está comprendida entre 4  
y 5.

A continuación se valoran los matraces de produc-  
ción diluyendo la muestra en solución reguladora 0,05 M  
20 a pH 8 hasta una concentración apropiada. El organismo  
de ensayo es Proteus vulgaris MB-838 y el medio de valo-  
ración es agar nutritivo más 0,2 % de extracto de leva-  
dura. Cuando se emplea la valoración con disco-placa o  
cilindro-placa, se vierten de 10 a 15 ml del medio por  
25 placa. Cuando se emplea el procedimiento del disco-placa,



ENE. 1970

1 los discos se sumergen en una solución de antibiótico  
que contiene 0,4 unidades por mililitro y se colocan  
sobre la placa en una posición alternada con la de la  
muestra. A continuación se incuban las placas a 37°C  
5 durante 18 horas y se determinan los diámetros de la  
zona en milímetros. Cuando se emplea el procedimiento  
del cilindro-placa, se utilizan 6 cilindros por placa,  
3 de la muestra y 3 de la solución de control, alter-  
nando la muestra y la solución de control. Esta última  
10 contiene 1  $\gamma$ /ml del ácido libre. Se emplean 5 placas  
normalizadas conteniendo 6 niveles del patrón compendi-  
dos entre 0,25  $\gamma$ /ml y 3,0  $\gamma$ /ml. La valoración se calcu-  
la mediante un nomograma y los resultados se dan como  
unidades o gammas por mililitro. Una unidad del ácido  
15 libre es igual a 2,8 gammas.

El antibiótico puede ser purificado y recuperado  
en forma más pura mediante varios procedimientos. Uno  
de estos procedimientos consiste en adsorber el antibió-  
tico sobre alúmina, siendo adecuada para esta purifica-  
ción la alúmina lavada al ácido o al álcali. El antibió-  
tico adsorbido puede ser eluído de la alúmina de la for-  
ma más conveniente mediante soluciones acuosas o hidro-  
20 alcohólicas de hidróxido amónico a un pH de 11,2 apro-  
ximadamente y recogiendo fraccionadamente el eluato. La  
25



1 purificación de las fracciones sólidas impuras que con-  
tienen la sal amónica de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-  
fosfónico también puede ser efectuada disolviendo este  
5 material en metanol, agregando un volumen igual de n-bu-  
tanol, separando el metanol por evaporación, separando  
por filtración la materia insoluble en butanol y recupe-  
rando una solución butanólica que contiene la sal amóni-  
ca del antibiótico de mayor pureza. La sal amónica puede  
10 ser obtenida después en forma sólida por evaporación de  
la solución butanólica a sequedad, bajo presión reducida.  
Alternativamente, la sal amónica puede ser extraída de la  
solución butanólica con agua para obtener una solución  
acuosa de la sal amónica de ácido (-) (cis-1,2-epoxi-  
15 propil)fosfónico. La sal cálcica del antibiótico se ob-  
tiene agregando hidróxido cálcico a la solución acuosa de  
la sal amónica y calentando la solución resultante a pre-  
sión reducida. Alternativamente, la sal cálcica se obtie-  
ne también pasando una solución de otra sal del antibió-  
20 tico sobre una resina cambiadora de catión en el ciclo  
cálcico. La sal cálcica cristaliza de las soluciones  
acuosas con una concentración de 10 mg/ml dejando en re-  
poso o con agitación. Estos procedimientos de purifica-  
ción están descritos con más detalle en la solicitud es-  
25 tadounidense copendiente de Louis Chalet, nº 699.377,  
presentada el 22 de Enero de 1968.

375244



1970

1 El ácido libre es un sólido cristalino blanco  
que se descompone a 170°C.

5 El ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico y  
sus sales son agentes antimicrobianos útiles, que son  
activos en la inhibición del crecimiento de las bacte-  
rias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas. Este  
antibiótico, y especialmente sus sales, son activos  
contra los agentes patógenos Bacillus, Escherichia,  
10 Staphylococci, Salmonella y Proteus y contra las varie-  
dades de los mismos resistentes a los antibióticos. Son  
ilustrativos de estos agentes patógenos los siguientes:  
Escherichia coli, Salmonella schottmuelleri, Salmonella  
gallinarum, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Proteus  
15 morganii y Staphylococcus aureus. Así, el ácido (-) (cis-  
1,2-epoxipropil)fosfónico y sus sales pueden ser utili-  
zados como agentes antisépticos para eliminar los organis-  
mos susceptibles del equipo farmacéutico, dental y médi-  
co y de otras zonas sometidas a la infección por tales  
organismos. Análogamente, pueden ser empleados para sepa-  
20 rar ciertos microorganismos de las mezclas de microorga-  
nismos. Las sales del ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-  
fosfónico también son útiles en el tratamiento de las  
enfermedades causadas por las infecciones bacterianas en  
el hombre y en los animales y son especialmente valiosas  
25 en este aspecto, ya que son activas contra las varieda-



1 des resistentes de agentes patógenos. Estas sales son especialmente valiosas porque son efectivas cuando se administran por vía oral, aunque también pueden ser administradas parenteralmente.

5 Los siguientes ejemplos se dan con fines ilustrativos y no a título de limitación:

EJEMPLO 1

10 A un cultivo inclinado de agar de Streptomyces fradiae NRRL B-3360 se agregan 10 ml de leche descremada estéril. La suspensión de leche descremada se liofiliza en tubos estériles individuales que contienen 0,1-0,2 ml de la suspensión y el cultivo secado por congelación es utilizado para inocular un erlenmeyer de 250 ml provisto de tabiques que contiene 40 ml de un medio de siembra de la siguiente composición:

15

A.

<u>Medio de siembra</u>	<u>Cantidad</u>
Harina de avena molida	10 g
Hidrolizado de levadura	10 g
20 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	50 mg
Solución reguladora de fosfato *	2 ml
Agua destilada	1000 ml

pH = 6,6

\* Solución reguladora de fosfato:  $KH_2PO_4$  = 91 g  
 $Na_2HPO_4$  = 95 g  
 25 agua destilada = 1000 ml.

**375244**



E. 1970

1 El matraz de siembra se incubó a 28°C durante  
1 día en un sacudidor rotatorio a 220 rpm, con un recor-  
rido de 2" (5 cm).

5 Se preparan ocho erlenmeyers de 250 ml, conte-  
niendo cada uno de ellos 50 ml de medio de la siguiente  
composición:

B.

	<u>Medio de producción complejo</u>	<u>Cantidad</u>
10	Avena molida	30,0 g
	Harina de soja	25,0 g
	Solubles de destilería	10,0 g
	Ascorbato sódico	0,5 g
	Agua destilada	1000 ml

pH = 6,5

15 Después se añade una solución acuosa de citrato  
sódico a los matraces para dar una concentración final  
de citrato sódico como la indicada en la Tabla siguien-  
te. A continuación estos matraces se esterilizan, se en-  
frían y se inoculan agregando 1,0 ml del medio de siem-  
bra preparado en la forma antes descrita. Los matraces  
20 inoculados se incuban a 28°C en un sacudidor rotatorio  
que opera a 220 rpm, con un recorrido de 2" (5 cm). Se  
retira un matraz al cabo de 3 días; otro matraz se re-  
tira después de 4 días de incubación. El contenido de  
25 cada uno de los matraces se centrifuga a 8500 rpm du-



1970

1 rante 10 minutos y el caldo se separa de los sólidos por  
 decantación. Los caldos que sobrenadan se valoran emplean-  
 do Proteus vulgaris MB-838 como organismo de ensayo. Los  
 resultados de la valoración del caldo obtenido después de  
 5 una incubación durante 3 y 4 días son los siguientes:

C.

Medio	Citrato sódico, 2H <sub>2</sub> O g/l	Antibiótico, unidades/ml	
		3 días	4 días
Base de producción compleja	0	2,3	2,4
10 Base de producción compleja	1,0	2,6	2,2
Base de producción compleja	2,0	2,7	2,4
Base de producción compleja	4,0	3,7	2,9
15 AUMENTO GLOBAL		58 %	21 %

EJEMPLO 2

La producción de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)-  
 fosfónico se realiza en la forma indicada en el Ejem-  
 20 plo 1. Se obtienen los siguientes resultados de las va-  
 loraciones:

25

375244



1970

1

A.

5

10

Medio	Citrato sódico. $2H_2O$ g/l	Antibiótico, unida des/ml	
		3 días	4 días
Base de producción compleja	0	2,1	2,5
Base de producción compleja	1,0	2,7	2,3
Base de producción compleja	2,0	3,0	2,9
Base de producción compleja	4,0	3,6	3,6
Base de producción compleja	8,0	4,1	4,1
AUMENTO GLOBAL		95 %	64 %

EJEMPLO 3

15

Se emplean 4 ml de células de un cultivo de agar inclinado de Streptomyces fradiae NRRL B-3360 de la siguiente composición:

A.

20

<u>Medio inclinado</u>	<u>Cantidad</u>
Almidón de maíz	10,0 g
Asparragina	1,0 g
$K_2HPO_4$	1,0 g
$H_2O$	1000 ml

pH = 7,0

25

para inocular un erlenmeyer de 250 ml provisto de tabi-



1970

1 ques conteniendo 40 ml de medio de siembra de la siguiente composición:

B.

	<u>Medio de siembra</u>	<u>Cantidad</u>
5	Almidón de maíz	10,0 g
	Asparragina	1,0 g
	$K_2HPO_4$	1,0 g
	$H_2O$	1000 ml

pH = 7,0

10 El matraz inoculado se incuba a 28°C durante 2 días en un sacudidor rotatorio a 220 rpm, con un recorrido de 2" (5 cm).

15 Se preparan seis erlenmeyers de 250 ml, conteniendo cada uno de ellos 30 ml de medio de la siguiente composición:

C.

	<u>Medio de producción químicamente definido</u>	<u>Cantidad</u>
	Almidón de maíz	20 g
20	$K_2HPO_4$	0,5 g
	Ascorbato sódico	0,5 g
	Citrato sódico	1,0 g
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,03 g
	Mezcla de elementos traza nº 2 *	10 ml
25	NaCl	0,3 g



E. 1970

	<u>Medio de producción químicamente definido</u>	<u>Cantidad</u>
1	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,5 g
	Bactoasparragina	5,0 g
5	D,L-metionina	1,0 g
	Glutamato monosódico	1,0 g
	Mezcla de vitaminas concentradas **	5,0 ml
	Agua destilada	1000 ml
	pH = 6,8-7,0	
10	*	
	<u>Fórmula de la mezcla de elementos traza nº 2</u>	
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0 g
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,0 g
	CuCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	25 mg
15	CaCl <sub>2</sub>	100 mg
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	56 mg
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	19 mg
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200 mg
20	Agua destilada	1000 ml

25

375244



1970

1 \*\*

Fórmula de la mezcla de vitaminas concentradas

<u>Vitamina</u>	<u>Peso</u>
Pantotenato cálcico	200 mg
5 B <sub>2</sub> (Riboflavina)	200 mg
B <sub>6</sub> (Piridoxina)	200 mg
B <sub>6</sub> (Piridoxal)	200 mg
Niacina	200 mg
Acido p-aminobenzoico	20 mg
10 Biotina	1,5 mg
B <sub>12</sub>	0,4 mg
B <sub>1</sub> (tiamina)	200 mg
Agua destilada	1000 ml

15 A continuación se agrega una solución acuosa de citrato sódico a los matraces para dar una concentración final de citrato sódico como la indicada en la siguiente tabla. Estos matraces se esterilizan, se enfrían y se inoculan mediante la adición de 1,0 ml del medio de siembra preparado en la forma antes descrita. Los matraces inoculados se incuban a 28°C en un sacudidor rotatorio que opera a 220 rpm con un recorrido de 2" (5 cm) y al cabo de 4 días de incubación se retira uno de los matraces. El contenido de cada uno de los matraces se centrifuga a 8500 rpm durante 10 minutos y el caldo se separa de los sólidos por decantación. Los caldos que so-

20

25

375244



1970

1 brenadan se valoran empleando Proteus vulgaris MB-838 como organismo de ensayo. Las valoraciones con el caldo obtenido después de incubar durante 3 y 4 días son las siguientes:

5

D.

10

Medio	Citrato sódico. $2H_2O$ g/l	Antibiótico unida des/ml	
		3 días	4 días
Base de producción química camente definida	1,0	0,59	0,56
Base de producción química camente definida	2,0	2,46	2,99
Base de producción química camente definida	4,0	3,97	4,11

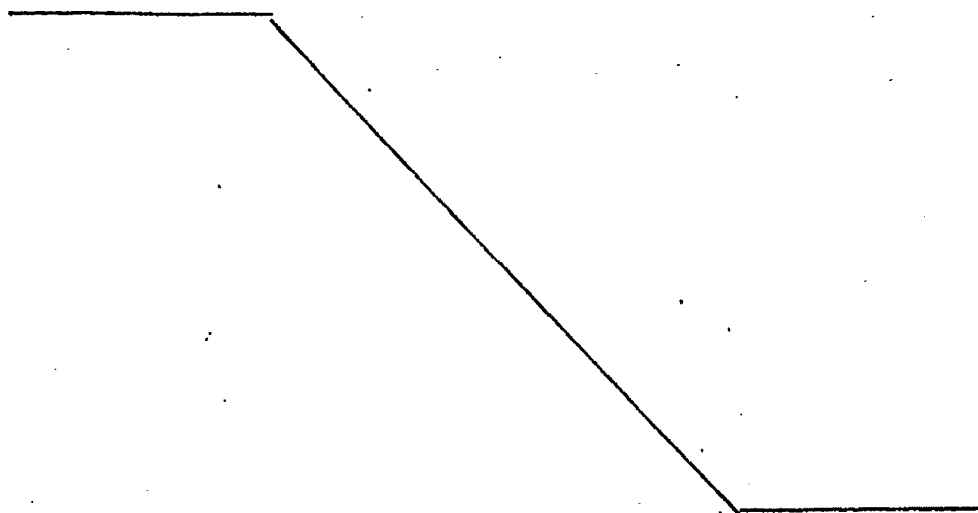
Una unidad es igual a 2,8  $\mu$ g/ml del ácido libre.

15

La adición de citrato sódico produce un aumento de la potencia de 6 ó 7 veces cuando la concentración aumenta de 1 a 4 g/litro.

20

25





1 En resumen, la Patente de Invención que se solli-  
cita, deberá recaer sobre las siguiente:

REIVINDICACIONES

5... 1. Perfeccionamientos introducidos en un proce-  
dimiento para la preparación de ácido (-) (cis-1,2-epoxi-  
propil)fosfónico que consiste en cultivar un microorganis-  
mo productor de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico  
en un medio nutritivo acuoso, en condiciones aerobias, has-  
ta que se ha comunicado a dicho medio una actividad antibió-  
tica sustancial, caracterizados los perfeccionamientos por  
10 que consisten en agregar citrato al medio nutritivo en for-  
ma de un compuesto de citrato para aumentar la producción  
de dicho antibiótico y recuperar el ácido (-) (cis-1,2-  
epoxipropil)fosfónico del caldo de fermentación resultante.

15 2. Perfeccionamientos según la reivindicación 1,  
en los que el microorganismo es Streptomyces.

3. Perfeccionamientos según la reivindicación 1,  
en los que el medio nutritivo contiene citrato equivalente  
a aproximadamente 0,65-5,2 gramos por litro de medio.

20 4. Perfeccionamientos según la reivindicación 1,  
en los que el medio nutritivo contiene citrato equivalente  
aproximadamente a 1,0-8,0 gramos por litro de medio cuando  
se agrega en forma de citrato sódico.

25 5. Perfeccionamientos introducidos en un procedi-  
miento para la preparación de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)



1 fosfónico que consiste en cultivar un microorganismo pro-  
ductor de ácido (-) (cis-1,2-epoxipropil)fosfónico en un  
medio nutritivo acuoso, en condiciones aerobias, hasta  
que se ha comunicado a dicho medio una actividad antibió-  
tica sustancial, caracterizados los perfeccionamientos por  
5... que según la reivindicación 1, consisten en ajustar el con-  
tenido en citrato del medio de fermentación mediante la  
adición de un compuesto de citrato hasta que se consigue  
una concentración de citrato esencialmente no tóxica supe-  
rior a 0,5 gramos por litro.

10 6. Perfeccionamientos según la reivindicación 2,  
en los que el Streptomyces es una variedad Streptomyces  
fradiae.

15 7. Perfeccionamientos según la reivindicación 2,  
en los que el Streptomyces es una variedad Streptomyces  
wedmorensis.

20 8. Perfeccionamientos según la reivindicación 2,  
en los que el Streptomyces es una variedad Streptomyces  
viridochromogenes.

25 9. Se reivindica por último como objeto sobre el  
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
"PERFECCIONAMIENTOS INTRODUCIDOS EN UN PROCEDIMIENTO PARA  
LA PREPARACION DE ACIDO (-) (CIS-1,2-EPOXIPROPIL)FOSFONICO"



1                    Todo conforme queda descrito y reivindicado en  
la presente Memoria descriptiva, que consta de veintiséis  
páginas mecanografiadas.

Madrid, 8 de enero de 1970.

5                    BERNARDO UNGRIA

P.D. 

10

15

20

375244

25 