

4 OCT. 1976  
CONCEDIDA

Int. Cl.: C12D/A61K

No 491.205

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., INC.

Domicilio: RAHWAY, New Jersey 07065, Estados Unidos.

Enunciado: UN METODO DE PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO  
FR-02A.

Prioridad: De las solicitudes de Patente estadouni-  
denses nos. 410.067 del 26 de Octubre de  
1.973, 436.425 del 25 de Enero de 1.974  
y 496.457 del 13 de Agosto de 1.974.

OF.



1

RESUMEN DE LA INVENCION

5

Esta invención se refiere a un nuevo agente anti-  
biótico que también posee actividad promotora del crecimien-  
to, aislado del caldo de fermentación de Streptomyces  
lactamdurans por extracción con disolvente y denominado  
FR-02A.

10

15

El FR-02A es un antibiótico que es eficaz contra  
bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y, por consiguien-  
te, puede ser utilizado en el tratamiento de un amplio espec-  
tro de infecciones en animales. Más especialmente, el FR-02A  
es eficaz contra el PPLO en pollitos, cerdos y ganado vacuno.  
Es eficaz contra la coccidiosis del ratón y contra los tipos  
más prevalentes de coccidiosis aviar. Es eficaz subcutáneamen-  
te contra la saculitis aérea M. gallisepticum en pollitos asa-  
deros y eficaz por vía oral en ratones en infecciones sistémi-  
cas producidas por Bordetella bronchiseptica. Además, el FR-02A  
puede ser utilizado como agente promotor del crecimiento en ani-  
males como pollitos, cerdos y ganado vacuno.

20

25

Esta invención se refiere a la nueva producción por  
fermentación y aislamiento de una sustancia antibiótica útil  
que hasta ahora no ha sido registrada en la técnica anterior.  
Más especialmente, esta invención se refiere a la preparación  
del antibiótico FR-02A por fermentación de Streptomyces  
lactamdurans bajo condiciones controladas, seguida de aisla-  
miento de dicho antibiótico no descrito hasta ahora, denomina-



1972

1 do FR-02A.

El antibiótico FR-02A se obtiene cultivando en condiciones controladas el microorganismo ya conocido, Streptomyces lactamdurans, en un caldo de fermentación y extrayendo el caldo completo con un disolvente orgánico polar no miscible con agua para obtener el antibiótico. La fermentación puede llevarse a cabo en medios que contienen materia nutriente en suspensión o predominantemente en medios transparentes, donde estos medios están prácticamente exentos de materia nutriente suspendida.

En el caso de que la fermentación se lleve a cabo en medios que contienen materia nutriente suspendida, el antibiótico se encuentra tanto en los sólidos que comprenden los micelios y la materia nutriente suspendida como en el caldo.

El antibiótico es aislado de los sólidos por separación de los mismos del caldo de fermentación por filtración, centrifugación u otro medio adecuado y extracción de la torta que comprende los sólidos con un disolvente orgánico, preferiblemente un disolvente orgánico polar. El antibiótico que queda en el caldo se aísla de este caldo, del que se han separado previamente los sólidos, por extracción con un disolvente orgánico polar no miscible con agua. Se observará que si se retrasa la cosecha, el nivel total de sólidos en el caldo de fermentación se reducirá y se encontrará una proporción menor del antibiótico en los sólidos recuperados del caldo.



1                    En los medios que no contienen materia nutriente  
suspendida, la mayor parte del FR-02A se encuentra en el cal-  
do de fermentación predominantemente transparente. En estos  
casos, el caldo de fermentación completo se extrae con un di-  
5                    solvente orgánico polar no miscible con agua, como cloroformo,  
para obtener el antibiótico. Alternativamente, cualquier  
sólido, por ejemplo los micelios, pueden ser separados del  
caldo antes de extraerlo con un disolvente orgánico polar no  
miscible. Además, para obtener el FR-02A residual, el micelio  
10                   separado del caldo se extrae con un disolvente orgánico polar  
adecuado para obtener el antibiótico FR-02A.

                    Un método preferido de obtención del antibiótico  
de esta invención consiste en cultivar, bajo condiciones con-  
troladas, el microorganismo ya conocido Streptomyces  
15                   lactamdurans, en un medio que contiene materia nutriente en  
suspensión o un medio transparente, esencialmente exento de ,  
materia nutriente suspendida y extraer el caldo completo con  
un disolvente orgánico polar no miscible con agua. La extrac-  
ción se realiza ajustando el pH del caldo a un valor ácido  
20                   y agregando el disolvente al caldo. Después de mezclar, los  
sólidos se separan del caldo. Se deja el caldo en reposo has-  
ta que se separa la capa de disolvente. Se retira esta última,  
se lava con agua, se seca con un agente desecante adecuado y  
se evapora a vacío. El residuo se lava con un disolvente orgá-  
25                   nico no polar como éter de petróleo o hexano y se seca al aire



21  
1 para dar el antibiótico FR-02A.

Otro método preferido de obtención del antibiótico FR-02A consiste en cultivar, en condiciones controladas, el microorganismo ya conocido Streptomyces lactamdurans en un medio que contiene materia nutriente en suspensión. El caldo de fermentación se filtra para recuperar los sólidos que comprenden el micelio y la materia nutriente suspendida. Después de secar lo más posible por succión la torta filtrada que comprende los sólidos, esta se agita en un disolvente orgánico polar y se filtra de nuevo. Después de haber lavado la torta con disolvente adicional, los extractos en disolvente y el disolvente de lavado combinados se evaporan a vacío para dar una suspensión acuosa. El pH se hace ácido. La suspensión acuosa se lava con un disolvente orgánico no polar como éter de petróleo, hexano y similares, hasta que las aguas de lavado son incoloras. La suspensión acuosa se vuelve a extraer con un disolvente orgánico polar. El extracto en disolvente se seca, se filtra y se evapora a vacío para dar el antibiótico FR-02A. Por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de la invención, el antibiótico FR-02A puede obtenerse en una forma con una pureza del orden del 40-50 %.

Alternativamente, la fermentación puede realizarse en un medio prácticamente exento de materia nutriente en suspensión. El caldo de fermentación se filtra para recuperar el micelio. Este último se extrae con un disolvente orgánico



21 OCT 1954

1 polar. El extracto se seca y se evapora a sequedad a vacío.  
El residuo se sacude con un disolvente orgánico no polar co-  
mo éter de petróleo, hexano y similares. El disolvente orgá-  
nico se decanta después de centrifugar para sedimentar el  
5 residuo. El residuo se seca al aire para obtener el antibió-  
tico FR-02A.

Todavía otro método preferido de obtención del  
antibiótico de esta invención consiste en cultivar, en con-  
diciones controladas, el microorganismo Streptomyces  
10 lactamdurans en un caldo de fermentación y extraer el caldo  
después de separar los sólidos que comprenden el micelio o  
el micelio y materia nutriente suspendida. El pH del caldo  
de fermentación se hace ácido y los sólidos que comprenden  
el micelio o el micelio y la materia nutriente suspendida  
15 se separan. El caldo de fermentación exento de sólidos se mez-  
cla con un disolvente orgánico polar no miscible con agua. Des-  
pués de mezclar, se deja que se separen las capas. Se retira  
la capa orgánica, se seca con un agente desecante adecuado y  
se evapora a sequedad a vacío. El residuo se lava con un di-  
20 solvente orgánico no polar como éter de petróleo o hexano y  
se seca al aire para obtener el antibiótico FR-02A.

En los procedimientos descritos, donde las extrac-  
ciones se realizan con disolventes orgánicos polares no misci-  
bles con agua, son ejemplos representativos de estos disolven-  
25 tes los ésteres alquílicos de los ácidos alcanóicos inferio-



1 res, como formiato de metilo, formiato de etilo, acetato de  
metilo, acetato de etilo, acetato de n-butilo, acetato de  
isobutilo, propionato de etilo; una cetona como ciclohexano-  
na; o un hidrocarburo inferior halogenado como cloroformo,  
5 cloruro de metileno, tetracloruro de carbono, dicloruro de  
etileno, 1-cloro-2,2-dimetilpropano, tetracloroetileno o bro-  
moformo.

En los procedimientos antes descritos donde las  
extracciones se realizan con disolventes orgánicos polares,  
10 son ejemplos representativos de estos disolventes los ésteres  
alquílicos inferiores de los ácidos alcanóicos inferiores co-  
mo formiato de metilo, formiato de etilo, acetato de metilo,  
acetato de etilo, acetato de n-butilo, acetato de isobutilo,  
propionato de etilo; una cetona como acetona, metil-etil-ce-  
15 tona o ciclohexanona; o un hidrocarburo inferior halogenado  
como cloroformo, cloruro de metileno, tetracloruro de carbo-  
no, dicloruro de etileno, 1-cloro-2,2-dimetilpropano, tetra-  
cloroetileno o bromoformo.

Además de la producción de FR-02A, se ha citado  
20 en la literatura que el S. lactamdurans NRRL 3802 elabora  
el antibiótico Cefamicina C (Antimicrobial Agents and Chemothe-  
rapy, Septiembre 1972, pág. 122-131, vol. 2, nº 3, "Cephamy-  
cins, a New Family of  $\beta$ -Lactam Antibiotics" y patente belga  
764.160). Como consecuencia de que el FR-02A es muy soluble  
25 en los disolventes orgánicos no miscibles con agua mientras

21 OCT 1968



1 que la Cefamicina C es prácticamente insoluble en los disol-  
ventes orgánicos no miscibles con agua, los dos materiales  
se separan fácilmente uno de otro. Por consiguiente, la ex-  
tracción del caldo con un disolvente no miscible con agua  
5 permite obtener cada uno de los antibióticos en una forma  
libre de contaminación por el otro.

El antibiótico FR-02A aislado del caldo de fermen-  
tación se somete a una nueva purificación por cromatografía  
a través de un tamiz molecular, seguido de cromatografía so-  
10 bre un agente adsorbente tensoactivo. Un tamiz molecular ade-  
cuado es un dextrano reticulado como el tamiz molecular cono-  
cido por el nombre comercial de Sephadex LH-20 de la Pharmacia  
Fine Cemicsals Inc. El FR-02A puede ser eluido mediante un  
alcanol inferior como el metanol. Un agente adsorbente tenso-  
15 activo adecuado es un copolímero macroporoso no iónico, hi-  
dróphobo, de poliestireno reticulado con divinilbenceno, cono-  
cido por los nombres comerciales de Rohm and Haas, Amberlite  
XAD-1 a XAD-12. Una resina preferida para purificar el FR-02A  
es la XAD-2. Los disolventes adecuados para eluir el FR-02A  
20 adsorbidos son las soluciones acuosas de los alcanoles infe-  
riores, v.g. soluciones acuosas de metanol, etanol, isopro-  
panol, butanol y similares. El disolvente preferido para  
eluir el FR-02A de la resina XAD-2 es una mezcla al 50 % de  
isopropanol y agua.  
25



1 El organismo que produce FR-02A es una variedad  
ya conocida de Streptomyces lactamdurans denominada MA-2908  
en la colección de cultivos de Merck and Co., Inc., Rahway,  
New Jersey. Fué aislado de una muestra de tierra y se ha colo-  
5 cado en depósito permanente sin restricciones en cuanto a su  
disponibilidad en la colección de cultivos de la Northern Uti-  
lization Research and Development Division, Agricultural Re-  
search Service, Departamento de Agricultura de Estados Unidos  
(anteriormente Northern Regional Research Laboratories), Peo-  
10 rria, Illinois 61604 y está a disposición del público bajo el  
número de cultivo NRRL 3802.

Los estudios completos de la taxonomía y morfología  
de Streptomyces lactamdurans se encuentran en la patente  
belga n<sup>o</sup> 764.160. Basándose en los estudios taxonómicos, el  
15 Streptomyces lactamdurans fué identificado como un nuevo acti-  
nomicete. Se encontró que pertenece al género Streptomyces y  
posee muchos atributos de la conocida especie Streptomyces  
fradiae. Bioquímicamente, los dos son casi perfectamente semejantes  
pero morfológicamente presentan importantes diferencias. Por ejem-  
20 plo, el micelio aéreo de S. fradiae es de color rosa de con-  
cha marina mientras que el S. lactamdurans presenta un color  
crema. Sobre la base de esta diferencia y otras característi-  
cas, se le dió el nombre de especie de Streptomyces lactamdurans  
a este microorganismo.

25 El Streptomyces lactamdurans es simplemente ilus-



1        trativo del tipo de variedad de microorganismo que puede ser  
utilizado en la producción de FR-02A y debe entenderse que es-  
ta invención no se limita a los organismos que cumplen estas  
descripciones particulares. Esta invención incluye el uso de  
5        otros microorganismos, incluidas las variedades de actinomicetes  
aisladas de la naturaleza u obtenidas por mutación como,  
por ejemplo, las obtenidas por selección natural o las produci-  
das por agentes mutantes, por ejemplo irradiación con rayos X,  
irradiación ultravioleta, mostazas nitrogenadas y similares  
10        que, bajo condiciones adecuadas, forman FR-02A.

          El FR-02A se produce durante la fermentación aero-  
bia de medios nutrientes acuosos adecuados, bajo condiciones  
controladas, por inoculación con el organismo Streptomyces  
lactamdurans. Los medios acuosos, como los empleados para la  
15        producción de otros antibióticos, son adecuados para producir  
el antibiótico FR-02A. Estos medios contienen fuentes de car-  
bono, nitrógeno y sales inorgánicas asimilables por el micro-  
organismo. La elección del medio no es crítica y la fermenta-  
ción puede efectuarse en medios que contienen materia nutrien-  
20        te en suspensión o en medios predominantemente transparentes,  
donde el medio está prácticamente exento de materia nutriente  
en suspensión.

          En general, pueden utilizarse, solos o en combina-  
ción, como fuentes de carbono asimilable en el medio nutriente  
25        los hidratos de carbono como azúcares, por ejemplo dextrosa,



1        glucosa, arabinosa, maltosa, rafinosa, xilosa, manitol y simi-  
lares y almidones como granos, por ejemplo, avena, centeno,  
almidón de maíz, harina de maíz y similares. La cantidad exac-  
ta de la fuente o fuentes de hidratos de carbono utilizada en  
5        el medio depende en parte de los otros ingredientes del medio  
pero, en general, la cantidad de hidratos de carbono habitual-  
mente varía entre alrededor de 1 % y 6 % del peso del medio.  
Estas fuentes de carbono pueden ser usadas individualmente o  
pueden combinarse en el medio varias de estas fuentes de car-  
10        bono. En general, pueden utilizarse muchos materiales proteicos  
como fuentes de nitrógeno en el proceso de fermentación. Las  
fuentes de nitrógeno adecuadas son, por ejemplo, caldo nutri-  
tivo, extracto de levadura, hidrolizados de levadura, levadu-  
ra primaria, harina de soja, harina de semilla de algodón, hi-  
15        drolizados de caseína, licor de infusión de maíz, solubles de  
destilería o pasta de tomate y similares. Las fuentes de nitró-  
geno, solas o en combinación, se emplean en cantidades que os-  
cilan aproximadamente entre 0,2 % y 6 % del peso del medio  
acuoso.

20                    Los medios descritos en los ejemplos son simplemen-  
te ilustrativos de la amplia variedad de medios que pueden em-  
plearse y no pretendemos que sean limitativos.

25                    La fermentación se realiza a temperaturas compren-  
didas aproximadamente entre 20°C y 37°C; sin embargo, para ob-  
tener resultados óptimos, es preferible llevar a cabo la fer-



21 OCT 1974

1           mentación a temperaturas de unos 24 a 32°C. El pH de los me-  
dios nutrientes adecuados para desarrollar el cultivo de  
Streptomyces lactamdurans y producir el antibiótico FR-02A  
debe estar comprendido entre 6,0 y 8,0 aproximadamente.

5           La fermentación a pequeña escala del antibiótico  
se lleva a cabo convenientemente inoculando un medio nutrien-  
te adecuado con un cultivo productor del antibiótico y, des-  
pués de transferir a un medio de producción, permitir que  
transcurra la fermentación a una temperatura constante de  
10          unos 28°C, en un sacudidor, durante varios días. Terminado  
el periodo de incubación, el micelio y la materia nutriente  
en suspensión pueden ser recuperados por centrifugación o  
filtración y extraídos con disolvente o bien el caldo com-  
pleto puede ser extraído con cloroformo u otros disolven-  
15          tes no miscibles con agua o alternativamente el caldo puede  
ser extraído después de separar los sólidos que comprenden el  
micelio o el micelio y la materia nutriente en suspensión.

La fermentación a pequeña escala se lleva a cabo  
en un matraz esterilizado mediante un desarrollo de siembra  
20          en 1,2, 3 o 4 etapas. El medio nutriente para la etapa de siem-  
bra puede ser cualquier combinación adecuada de fuentes de car-  
bono y nitrógeno. El matraz de siembra se sacude en una cáma-  
ra a una temperatura constante de unos 28°C durante un perio-  
do de 1 a 2 días y algo del cultivo resultante se utiliza pa-  
25          ra inocular una segunda fase de siembra o el medio de produc-



1           ción. Cuando se utilizan matraces de siembra de fases inter-  
medias, se desarrollan prácticamente de la misma forma; es  
decir, parte del contenido del matraz se utiliza para inocu-  
lar el medio de producción. Los matraces inoculados se sacu-  
5           den a temperatura constante durante varios días y al final  
del periodo de incubación, el antibiótico FR-02A se aísla co-  
mo ya se ha descrito.

          Para el trabajo a gran escala, es preferible efec-  
tuar la fermentación en tanques adecuados provistos de un  
10           agitador y medios para airear el medio de fermentación. De  
acuerdo con este método, el medio nutriente se prepara en  
el tanque y se esteriliza calentando a temperaturas de hasta  
unos 120°C. Después de enfriar, el medio esterilizado se ino-  
cula con una siembra previamente desarrollada del cultivo pro-  
15           ducido y se permite que transcurra la fermentación durante  
un periodo de varios días como, por ejemplo, de 2 a 4 días  
mientras se agita y/o airea el medio nutriente y se mantiene  
la temperatura a unos 28°C. El rendimiento de FR-02A está  
comprendido generalmente entre 20 mg y 200 mg por litro de  
20           caldo de producción, determinado por bioanálisis.

#### Procedimiento de análisis

          Se realizaron análisis por el procedimiento de  
disco-placa utilizando discos de papel de filtro de 3/8"  
25           (9,3 mm). Las placas de ensayo se prepararon utilizando ágar  
nutriente Difco más 2,0 g/litro de extracto de levadura Difco



1 a razón de 10 ml por placa. Un cultivo de una noche del or-  
ganismo de ensayo, Vibrio percolans, American Type Culture  
Collection (ATCC 8461) en caldo nutriente más 0,2 % de ex-  
tracto de levadura se diluyó en solución salina estéril has-  
5 ta formar una suspensión con una transmitancia del 40 % a  
una longitud de onda de 660 m $\mu$ . Esta suspensión se agregó  
a 20 ml/litro de medio antes de verterla en las placas.

Las placas de ensayo se mantuvieron a 4°C hasta  
el momento de su uso (5 días como máximo). Después de la apli-  
10 cación de los discos de ensayo saturados de antibiótico, las  
placas se incubaron a 28°C durante un periodo de 16 a 24 ho-  
ras. Las zonas de inhibición se leyeron como mm de diámetro.  
Se utilizaron para determinar las potencias relativas o, cuan-  
do se compararon con un patrón de referencia purificado, la  
15 potencia en  $\mu\text{g/ml}$ . Se realizaron análisis de FR-02A en caldo  
de fermentación, micelios y materia nutriente suspendida se-  
parados de los caldos de fermentación y en caldos exentos de  
sólidos después de extraer el FR-02A en un disolvente adecuado. Los ensa-  
yos sobre soluciones conteniendo FR-02A, 200  $\mu\text{g/ml}$  empleando  
20 discos de 3/8" (9,3 mm) presentaban zonas de inhibición de  
16 mm. Cuando este ensayo se realiza de forma cuantitativa,  
pueden detectarse de 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$  de antibiótico.

El FR-02A presenta actividad contra bacterias  
Gram-negativas y Gram-positivas, coccidios y especies de  
25 Mycoplasma. In vitro, el FR-02A es eficaz contra E. acervulina,



1 Bordetella, Streptococcus faecalis, Streptococcus faecum,  
Streptococcus agalactiae, Streptococcus pyogenes, Proteus  
2 vulgaris, M. Hyorhinis, M. synoviae, M. arthritidis, M.  
gallisepticum y especies de Pasteurella. También se ha encon  
5 trado actividad contra Vibrio percolans (ATCC 8461), Salmonella  
gallinarum (MB 1287), E. coli MB 1418), Klebsiella pneumoniae  
(MB 1264), Pseudomonas stutzeri (MB 1231) y (MB 2765),  
Bacillus subtilis (MB 964) y (MB 797), Staphylococcus aureus  
(MB 108), (MB 210) y (MB 703) y Pseudomonas aeruginosa  
10 (MB 3210).

El FR-02A es útil tanto como antibiótico como  
como agente promotor del crecimiento de los animales.

15 Cuando el FR-02A se emplea como antibiótico, los  
medios específicos utilizados para administrarlo al animal  
no son críticos y resulta satisfactorio cualquiera de los mé-  
todos ahora empleados o asequibles para el tratamiento de los  
animales infectados o de los animales susceptibles de  
infección.

20 El FR-02A puede ser utilizado como antibiótico,  
por ejemplo en forma de preparados farmacéuticos que lo con-  
tienen en mezcla o combinación con un excipiente farmacéuti-  
co orgánico o inorgánico, sólido o líquido, adecuado para ad-  
ministración enteral, parenteral o local. Los excipientes  
25 adecuados son sustancias que no reaccionan con el antibióti-  
co, por ejemplo: agua, gelatina, lactosa, almidones, alcohol



1        estearílico, estearato magnésico, talco, aceites vegetales,  
alcoholes bencílicos, gomas, propilenglicol, polialquilengli-  
2        coles, jalea de petróleo blanca, colesterol u otros exci-  
3        pientes medicinales conocidos. Los preparados farmacéuticos  
4        pueden ser, por ejemplo, tabletas, grageas, ungüentos, cre-  
5        mas o cápsulas o en forma de soluciones, suspensiones o emul-  
6        siones líquidas. Pueden ser esterilizados y/o contener coadyu-  
7        vantes, tales como agentes preservativos, estabilizantes, mo-  
8        jantes o emulgentes; promotores de la disolución, sales para  
9        regular la presión osmótica o reguladores del pH.  
10

11                    Cuando se desea administrar el antibiótico en una  
12        forma de dosis unitaria sólida y seca, se emplean cápsulas,  
13        bolos o tabletas que contienen la cantidad deseada de anti-  
14        biótico. Estas formas de dosificación se preparan mezclando  
15        íntima y uniformemente el ingrediente activo con diluyentes,  
16        cargas, agentes desintegrantes y/o ligantes finamente divi-  
17        didos, adecuados, como almidón, lactosa, talco, estearato  
18        magnésico, gomas vegetales y similares. Estos preparados en  
19        dosis unitarias pueden variar ampliamente en lo que se refie-  
20        re a su peso total y contenido de PR-02A, dependiendo de fac-  
21        tores tales como el tipo de animal huésped que ha de ser tra-  
22        tado, la gravedad y el tipo de infección y el peso del hués-  
23        ped. El antibiótico puede ser administrado diariamente a do-  
24        sis de alrededor de 5 a 100 mg por kg de peso corporal.  
25

                  Dentro de esta invención están incluidas las sales



1 no tóxicas y farmacéuticamente aceptables del FR-02A, por  
ejemplo las sales de metales alcalinos y alcalino-térreos  
como las derivadas de sodio, potasio, amonio y calcio o sa-  
les con bases orgánicas, por ejemplo trietilamina, N-etil-  
5 piperidina y dibenciletilendiamina.

Además de su empleo como antibióticos, el FR-02A  
es útil como aditivo de los piensos para promover el creci-  
miento de los animales como pollitos, ovejas y ganado vacuno.  
El uso del FR-02A reduce el tiempo requerido para que los ani-  
10 males adquieran el peso comercial.

Cuando se emplea el FR-02A como promotor del desa-  
rrollo en los animales, puede ser administrado como componen-  
te del pienso de los animales o puede ser disuelto o suspen-  
dido en el agua de bebida.

15 Cuando el FR-02A se emplea como componente del  
pienso de los animales, se formula primero como suplemento  
alimenticio. En estos suplementos alimenticios, el FR-02A es-  
tá presente en cantidades relativamente concentradas e inti-  
mamente dispersado en un vehículo o diluyente inerte. El su-  
20 plemento alimenticio puede ser agregado directamente al pien-  
so o puede formarse una mezcla previa con él mediante una  
operación intermedia de dilución o mezclado. Por vehículo  
inerte se entiende el que no reacciona con el antibiótico y  
puede ser administrado con seguridad a los animales. Prefe-  
25 riblemente, el vehículo es o puede ser un ingrediente de la



21 00 1971

1 ración del animal. Los vehículos o diluyentes típicos ade-  
cuados para estas composiciones son, por ejemplo, granos se-  
cos de destilería, harina de maíz, harina de cítricos, re-  
suidos de fermentación, cáscaras de ostras molidas, salvado  
5 de trigo, solubles de melaza, harina de tusas de maíz, pien-  
so de molino de soja comestible, salvado de soja, piedra ca-  
liza machacada y similares. El antibiótico se dispersa ínti-  
mamente en el vehículo por métodos como molienda, agitación,  
molturación o volteo. Las composiciones que contienen alrede-  
10 dor de 5 a 50 % en peso del antibiótico son especialmente ade-  
cuadas como suplementos para piensos.

Como ejemplos de suplementos alimenticios típicos  
que contienen el FR-02A disperso en un vehículo sólido cita-  
remos los siguientes:

15

	<u>Kg</u>
(A) FR-02A	5
Ahechaduras de trigo molido	95
(B) FR-02A	50
Granos de destilería de maíz	50

20 Estos y otros suplementos alimenticios similares se pre-  
paran mezclando uniformemente el antibiótico con el vehículo.

El suplemento alimenticio puede ser agregado directamen-  
te al pienso o bien puede formarse una mezcla previa median-  
te una operación intermedia de dilución o mezclado con un  
25 vehículo oralmente ingerible. Las composiciones que contienen



1 de 0,03 % a 5 % en peso del antibiótico son especialmente  
adecuadas como mezclas previas. Estas mezclas previas se  
preparan mezclando uniformemente el antibiótico con un vehí-  
culo oralmente ingerible.

5 Estos suplementos o mezclas previas se agregan  
al pienso del animal en una cantidad suficiente para que  
el pienso terminado tenga la concentración de FR-02A deseada  
para la promoción del crecimiento. En los pollitos, el FR-02A  
se administra a una concentración final comprendida entre  
10 50 g y 300 g por Tm de pienso con objeto de conseguir el re-  
sultado deseado de promoción del crecimiento. En el caso de  
los cerdos, incluidos los cerdos infectados con M. hyorhinis,  
el FR-02A puede ser administrado en el pienso en proporció-  
nes similares.

15 En la discusión anterior de esta invención, se ha  
insistido en las composiciones sólidas donde el FR-02A se  
mezcla con un vehículo comestible en un suplemento alimenticio,  
en una llamada premezcla o en el pienso final. Este es  
el método preferido de administración del FR-02A. Otro méto-  
do consiste en disolver o suspender el FR-02A en el agua de  
20 bebida de los animales. La cantidad que puede ser suspendida  
en el agua sin sedimentación indebida es limitada. Para este  
último fin pueden emplearse emulgentes o agentes tensoactivos.

25 Análogamente, los expertos en la técnica entenderán  
que las formulaciones especiales de suplementos alimenticios



1 y piensos animales acabados conteniendo FR-02A también pue-  
den incluir vitaminas, otros antibióticos y agentes promo-  
tores del crecimiento y otras sustancias nutritivas.

5 El FR-02A es útil contra el PPL0 aviar en una pro-  
porción de 5 a 100 mg/kg. Un intervalo preferido para una so-  
la dosis es de 35 a 45 mg/kg. Por razones de comodidad, un  
método preferido de administración del antibiótico en el tra-  
tamiento del PPL0 consiste en mezclar el FR-02A con el pien-  
so del animal. Un intervalo preferido para el PPL0 es de  
10 0,0055 % a 0,02 % del peso del pienso.

En el tratamiento de la saculitis aérea en pollos  
asaderos, la  $DE_{50}$  es de 40 a 100 mg/kg. Por consiguiente, una  
dosis útil de FR-02A puede variar entre 10 y 150 mg/kg.

15 Una solución o suspensión para inyección subcutá-  
nea para el tratamiento de la saculitis aérea en los pollos  
asaderos puede ser preparada como sigue:

Solución o suspensión subcutánea conteniendo 20 mg de FR-02A  
por ampolla

20 FR-02A 20 mg  
Diluyente: Agua estéril para inyección 2 cc.

En el tratamiento de la coccidiosis, el método pre-  
ferido de administración del FR-02A es en el pienso a una pro-  
porción de 0,05 a 2 % del peso del pienso, aproximadamente.

25 Se observará que la dosis a administrar depende  
en alto grado del estado y peso del huésped; se prefiere la



1 vía parenteral para la saculitis aérea y la vía oral para  
el PPLO y la coccidiosis. La vía preferida de administra-  
ción del FR-02A para la promoción del crecimiento consiste  
en mezclarlo con el pienso.

5 Los ejemplos que siguen ilustran los métodos me-  
diante los cuales puede obtenerse el producto de esta inven-  
ción. El procedimiento reivindicado es susceptible de amplias  
variaciones y modificaciones y, por lo tanto, cualquier des-  
viación pequeña o ampliación del mismo se considera al alcan-  
ce del experto en esta técnica y comprendida dentro de los lí-  
mites de la invención.

#### EJEMPLO 1

#### Producción de antibiótico FR-02A mediante fermentación en ma- traz sacudido de *Streptomyces lactamdurans*

15 Como inóculo se utiliza un cultivo liofilizado de  
*Streptomyces lactamdurans*, denominado MA-2908.

El cultivo liofilizado se abre en un matraz Erlen-  
meyer de 250 ml y 3 tabiques, conteniendo 40 ml del medio de  
siembra de la primera fase:

#### 20 Medio de siembra de la primera fase

Levadura primaria 1 %  
en agua destilada  
pH ajustado a 7,0 con NaOH

25 El matraz de siembra de la primera fase y los pos-  
teriores matraces de segunda fase y producción son incubados



1 a 28°C en un sacudidor rotatorio que opera a 220 rpm.

Al cabo de 2 días en el medio de la primera fase, se inocula 1 ml del matraz de siembra de la primera fase en 40 ml del medio de siembra de la segunda fase contenido en un matraz Erlenmeyer de 3 tabiques y 250 ml.

Medio de siembra de la segunda fase

Ardamine YEP (99F) 1 %

en agua destilada

pH ajustado a 7,0 con NaOH

10 El matraz de siembra de la segunda fase se incubaba durante un día y después se inocula 1 ml del cultivo en cada uno de los 10 matraces Erlenmeyer de 250 ml, sin tabiques, que contienen 40 ml de medio de producción:

Medio de producción

15 Levadura primaria 1 %

Solubles de destilería 3 %

Glicina 0,05 %

L-fenilalanina 0,3 %

Almidón de maíz 2,0 %

20 Dimetilformamida 1,0 % (en volumen)

Mobil par-S antiespumante 0,25 % (en volumen)

en agua destilada

pH ajustado a 7,0 con NaOH.

25 Se prepara una solución de tiosulfato sódico disolviendo 12,5 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de agua destilada. Es-



1 ta solución se esteriliza por filtración y después se añade  
1 ml de la misma a cada uno de los 10 matraces de producción.

Los 10 matraces son incubados durante 4 días a 28°C  
y cosechados.

5 Aislamiento de FR-02A

El pH de los 400 ml de caldo anteriormente obtenido  
se ajusta a 5 con ácido clorhídrico y se añaden 2 volúmenes  
de cloroformo al caldo. Después de mezclar íntimamente, el  
caldo se filtra a través de una capa de Supercel. Se añade  
10 agua suficiente para acelerar la filtración. El filtrado se  
deja en reposo hasta que se separa la capa de cloroformo. Es  
ta última se retira, se lava dos veces con 500 ml de agua, se  
seca sobre sulfato magnésico anhidro y se evapora a sequedad  
a vacío. Se añaden 500 ml de éter de petróleo al residuo sólido  
15 y el sólido se recoge por filtración, se lava con 50 ml  
de éter de petróleo y se seca al aire para dar 144 mg de  
FR-02A. El FR-02A se convierte en la sal amónica por liofiliza-  
ción de una solución del FR-02A en 50 ml de agua alcaliniza-  
da a pH 10 con hidróxido amónico. Después de liofilizar, el  
20 producto pesa 140 mg.

Como el FR-02A se encuentra en asociación con el mi-  
celio y la materia nutriente suspendida, el micelio y la ma-  
teria nutriente suspendida pueden ser separados primero por  
filtración del caldo de fermentación y el FR-02A extraído de  
25 la torta filtrada con un disolvente orgánico polar miscible



1 con agua, como la acetona. Este método alternativo de aislamiento del FR-02A es descrito a continuación:

5 Se filtran 400 ml del caldo completo obtenido en la fermentación anterior para recuperar el micelio y la materia nutriente suspendida. La torta filtrada se agita después en 40 ml de acetona durante 30 minutos y se filtra de nuevo. La torta se lava con 15 ml de acetona. El extracto y las aguas de lavado acetónicos combinados se evaporan a vacío a 30°C para separar la acetona. El residuo se recoge en 10 15 ml de agua. El pH se ajusta a 4,0 con ácido clorhídrico.

Se añade un volumen igual de hexano y se agita durante 10 minutos. Después de sedimentar, se decanta el hexano y se desprecia. Se realizan otras dos extracciones más con volúmenes iguales de hexano, siendo la última incolora.

15 Después la suspensión acuosa se extrae con un volumen igual de cloroformo. Se realiza un segundo extracto con un volumen igual y se combina con el primer extracto. Se desprecia la fase acuosa.

20 El extracto clorofórmico se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se evapora a vacío para dar 106 mg de FR-02A.

25 Se determina que el peso molecular del FR-02A es alrededor de 1000, sometiendo el material obtenido en el proceso de fermentación antes descrito a cromatografía sobre Sephadex LH-20. El material obtenido mediante este tratamiento



1 es recromatografiado sobre Amberlite XAD-2 para obtener una muestra analíticamente pura.

Cromatografía sobre gel de Sephadex LH-20

5 Una solución de 0,5 ml de metanol conteniendo 106 mg de FR-02A, obtenido en el Ejemplo 1 anterior, se carga en un lecho de 75 ml (1,25 cm de diámetro x 56 cm de altura) de gel de Sephadex LH-20 en metanol (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Piscataway, N.J.). La columna se desarrolla con metanol. La corriente de eluato se explora con un refractómetro diferencial Meeco y el registro indica 3 picos de masa. Las fracciones se bioensayan a una dilución de 1-10 con discos de papel de 0,5" (12,7 mm) de diámetro sobre placas de ensayo por difusión de ágar sembradas con Vibrio percolans. Se obtienen unas zonas de inhibición correspondientes al tercer pico de masa (K<sub>D</sub> = 0,3) detectado. Las fracciones correspondientes al tercer pico de masa se combinan y evaporan para dar 43 mg de FR-02A.

15 Cuando el producto se analiza en el bioensayo anterior de difusión en ágar utilizando Vibrio percolans se obtiene una zona de inhibición de 16 mm a una concentración de 200 µg/ml. La absorción U.V. en solución reguladora de fosfato a pH 7,0 es:

25

$$\lambda_{\max} 327 \text{ nm } E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 216$$
$$\lambda_{\max} 232 \text{ nm } E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 464$$



1                   La purificación con gel Sephadex LH-20 puede ser  
omitida si el producto obtenido en el Ejemplo 1 se disuelve  
en agua a un pH de 9 (pH ajustado con solución diluida de  
hidróxido sódico) y se filtra para separar la materia inso-  
5                   luble y el filtrado se liofiliza.

Cromatografía sobre resina Amberlite XAD-2

Los 43 mg del producto LH-20 se purifican además  
por cromatografía en un lecho de 150 ml (1,25 cm de diáme-  
tro x 112 cm de altura) de resina Amberlite XAD-2 (Rohm and  
10                   Haas Co., Phila., Pa) en isopropanol-agua al 50 %. La carga  
se acidula a pH 2 para convertirla en la forma de ácido libre  
antes de aplicarla a la columna. La columna se explora median-  
te un refractómetro diferencial Meeco y el registro indica  
2 picos de masa. Los bioensayos de difusión en ágar utilizan-  
15                   do discos de 1/4" (6,3 mm) de diámetro y placas de Vibrio  
percolans indican que el pico de masa centrado a  $K_D$  3,5 a  
4,0 contiene el antibiótico. Las fracciones correspondientes  
a estos valores de  $K_D$  se combinan y evaporan a sequedad a  
vacío. Se obtienen 16,4 mg del antibiótico FR-02A. El FR-02A  
20                   se obtiene en forma de sólido amarillo pálido, estable a la  
manipulación normal y analíticamente puro.

EJEMPLO 2

Producción de antibiótico FR-02A por fermentación en matraz  
sacudido de Streptomyces lactamdurans

25                   Se emplea como inoculum un cultivo liofilizado de



1 Streptomyces lactamdurans denominado MA-2908.

El liofilizado se abre en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, de 3 tabiques, que contiene 40 ml de medio de siembra de primera fase:

5 Medio de siembra de la primera fase

Levadura primaria 1 %

en agua destilada

pH ajustado a 7,0 con NaOH

10 El matraz de siembra de la primera fase y los posteriores matraces de segunda fase y producción, se incuban a 28°C en un sacudidor rotatorio que funciona a 220 rpm.

Después de 2 días en el medio de la primera fase, se incula 1 ml del matraz de siembra de la primera fase en 40 ml del medio de siembra de la segunda fase contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y 3 tabiques.

15

Medio de siembra de la segunda fase

Ardamine YEP (99F) 1 %

en agua destilada

pH ajustado a 7,0 con NaOH

20

El matraz de siembra de la segunda fase se incubaba durante un día y después se incula 1 ml del cultivo en cada uno de los 10 Erlenmeyers de 250 ml sin tabiques que contienen 40 ml de medio de producción, cuya composición es la siguiente:

25

---



1

Medio de producción

5

Licor de infusión de maíz	2,8 % en peso
Cerelesa	5,6 % en peso
Proflo	2,8 % en peso
Glicerol	1,4 % en volumen
Dimetilformida	1,4 % en volumen
en agua corriente	

El pH se ajusta a 7,3 con NaOH.

10

Se añade una gota del antiespumante P-2000 a cada uno de los matraces antes de introducirlos en el autoclave.

15

Se prepara una solución de tiosulfato sódico disolviendo 6,25 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de agua destilada. Esta solución se esteriliza por filtración y después se añaden 0,5 ml de la misma a cada uno de los matraces de producción después de haberlos tratado en autoclave.

Los 10 matraces de producción (totalizando 400 ml) se incuban entonces durante 5 días a 28°C y se cosechan.

20

Se reúne el contenido de los 10 matraces, se reduce el pH a 5,5 con ácido clorhídrico, después se añaden 500 ml de cloroformo y la mezcla se agita durante media hora a la temperatura ambiente. Después la mezcla se centrifuga para separar las fases y se desprecia la fase acuosa. La capa cloroformica se seca sobre sulfato magnésico anhidro y el disolvente se evapora a vacío. El residuo se sacude con 30 ml de hexano. El hexano se separa por decantación después de cen-

25



1       trifugar el residuo. Al residuo se añaden 30 ml de agua,  
 alcalinizada a pH 10 con hidróxido amónico, para formar una  
 solución ligeramente turbia. Para el bioensayo, se reduce el  
 pH a 8,3 con HCl y se diluye en agua a pH 8,3 para realizar  
 5       el ensayo de disco. El bioensayo indica que el rendimiento en  
 el matraz de fermentación ha sido de 327 microgramos de  
 FR-02A por mililitro de caldo de fermentación o 130 mg en  
 total.

EJEMPLO 3

10       Producción del antibiótico FR-02A por fermentación en matraz  
 sacudido de Streptomyces lactamdurans

Se emplea como inoculum un cultivo liofilizado de  
Streptomyces lactamdurans denominado MA-2908.

15       El liofilizado se abre en un matraz Erlenmeyer de  
 250 ml, de 3 tabiques, conteniendo 40 ml del medio de siem-  
 bra de la primera fase:

Medio de siembra de la primera fase

Levadura primaria                   1 %

en agua destilada

20       pH ajustado a 7,0 con NaOH

El matraz de siembra de la primera fase y los sub-  
 siguientes matraces de producción se incuban a 28°C en un  
 sacudidor rotatorio que funciona a 220 rpm.

25       Al cabo de 2 días en el medio de siembra de la pri-  
 mera fase, se inocula 1 ml del matraz de siembra de la prime-



1 ra fase en cada uno de los 10 matraces Erlenmeyer de 250 ml, sin tabiques, que contienen 40 ml de medio de producción esencialmente exento de materia nutriente suspendida y con la siguiente composición:

5 Medio de producción

Caldo nutriente (Difco)	0,8 %
Extracto de levadura(Difco)	0,2 %
Dextrosa	1,0 %
en agua destilada	

10 Se añade una gota del antiespumante P-2000 a cada uno de los matraces antes de introducirlos en el autoclave.

Los 10 matraces de producción se incuban después durante 5 días a 28°C y se cosechan.

Aislamiento de FR-02A

15 Se reúne el contenido de los 10 matraces de producción (que totaliza 400 ml), se reduce el pH a 5,5 con ácido clorhídrico y el caldo se filtra para separar el micelio. El filtrado transparente se mezcla después con 500 ml de cloroformo y se agita durante media hora. A continuación la mezcla se centrifuga para separar las fases y se despreja la fase acuosa. La capa de cloroformo se seca sobre sulfato magnésico anhidro y se evapora a sequedad a vacío. El residuo se lava con 30 ml de hexano y se seca al aire para obtener el antibiótico FR-02A.

20

25



1

EJEMPLO 4

Producción de antibiótico FR-02A por fermentación en matraz  
sacudido de Streptomyces lactamdurans

5

Se emplea como inóculo un cultivo liofilizado de Streptomyces lactamdurans denominado MA-2908.

El liofilizado se abre en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, de 3 tabiques, que contiene 40 ml del medio de siembra de la primera fase:

Medio de siembra de la primera fase

10

Levadura primaria 1 %

en agua destilada

pH ajustado a 7,0 con NaOH

15

El matraz de siembra de la primera fase y los matraces de producción subsiguientes se incuban a 28°C en un sacudidor rotatorio que opera a 220 rpm.

20

Al cabo de 2 días en el medio de siembra de la primera fase, se inocula 1 ml del matraz de siembra de la primera fase en cada uno de los 10 matraces Erlenmeyer de 250 ml, sin tabiques, que contienen 40 ml de medio de producción esencialmente exento de materia nutriente suspendida y con la siguiente composición:

Medio de producción

25

Caldo nutriente (Difco) 0,8 %

Extracto de levadura (Difco) 0,2 %

Dextrosa 1,0 %



1

en agua destilada

Se añade una gota de antiespumante P-2000 a cada uno de los matraces antes de tratarlos en autoclave.

5

Los 10 matraces de producción se incuban después durante 5 días a 28°C y se cosechan.

#### Aislamiento de FR-02A

10

Se reúne el contenido de los 10 matraces de producción (que totaliza 400 ml), se reduce el pH a 5,5 con ácido clorhídrico y la mezcla se filtra para recuperar el micelio. El micelio se extrae con 500 ml de cloroformo. El extracto clorofórmico se seca sobre sulfato magnésico anhidro y se evapora a sequedad a vacío. El residuo se lava con 30 ml de hexano y se seca al aire para obtener el antibiótico FR-02A.

15

#### EJEMPLO 5

#### Producción de antibiótico FR-02A por fermentación en matraz sacudido de *Streptomyces lactamdurans*

Se emplea como inoculum un cultivo liofilizado de *Streptomyces lactamdurans* denominado MA-2908.

20

El liofilizado se abre en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, de 3 tabiques, conteniendo 40 ml de medio de siembra de la primera fase:

#### Medio de siembra de la primera fase

25

Levadura primaria	1 %
en agua destilada	



1                   pH ajustado a 7,0 con NaOH.

El matraz de siembra de la primera fase y los subsiguientes matraces de producción se incuban a 28°C en un sacudidor rotatorio que opera a 220 rpm.

5                   Después de 2 días en el medio de siembra de la primera fase, se inocula 1 ml del matraz de siembra de la primera fase en cada uno de los 10 Erlenmeyer de 250 ml, sin tabiques, que contienen 40 ml de medio de producción prácticamente exento de materia nutriente suspendida y con la siguiente  
10                   composición:

Medio de producción

Caldo nutriente (Difco)	0,8 %
Extracto de levadura (Difco)	0,2 %
Dextrosa	1,0 %

15                   en agua destilada

Se agrega una gota de antiespumante P-2000 a cada matraz antes del tratamiento en autoclave.

Los 10 matraces de producción se incuban después durante 5 días a 28°C y se cosechan.

20                   Aislamiento del FR-02A

Se reúne el contenido de los 10 matraces de producción (que totaliza 400 ml), se reduce el pH a 5,5 con ácido clorhídrico. Se añaden 500 ml de cloroformo y la mezcla se agita durante media hora a la temperatura ambiente. Después la mezcla se centrifuga para separar las fases y se  
25



1 desprecia la fase acuosa. La capa clorofórmica se seca so-  
bre sulfato magnésico anhidro y se evapora a sequedad a va-  
cío. El residuo se lava con 30 ml de hexano y se seca al  
aire para obtener el antibiótico FR-02A.

5 EJEMPLO 6  
Producción del antibiótico FR-02A por fermentación en matraz  
sacudido de Streptomyces lactamdurans

Se emplea como inoculum un cultivo liofilizado de  
Streptomyces lactamdurans denominado MA-2908.

10 El liofilizado se abre en un matraz Erlenmeyer de  
250 ml, de 3 tabiques, conteniendo 40 ml de un medio de siem-  
bra de la primera fase:

Medio de siembra de la primera fase

15 Levadura primaria 1 %  
en agua destilada  
pH ajustado a 7,0 con NaOH

El matraz de siembra de la primera fase y los sub-  
siguientes matraces de la segunda fase y de producción se in-  
cuban a 28°C en un sacudidor rotatorio que opera a 220 rpm.

20 Al cabo de 2 días en el medio de la primera fase,  
se inoculara 1 ml del matraz de siembra de la primera fase en  
40 ml del medio de la segunda fase contenidos en un matraz  
Erlenmeyer de 250 ml, de 3 tabiques.

25 ---  
---



1                    Medio de siembra de la segunda fase

Ardamine YEP (99F)                    1 %

en agua destilada

pH ajustado a 7,0 con NaOH

5                    El matraz de siembra de la segunda fase se incuba durante un día y después se inocula 1 ml del cultivo en cada uno de los 10 matraces Erlenmeyer de 250 ml, sin tabiques, que contienen 40 ml de medio de producción con la siguiente composición:

10                    Medio de producción

Licor de infusión de maíz            2,8 % en peso

Cerelesa                                5,6 % en peso

Proflo                                    2,8 % en peso

Glicerol                                1,4 % en volumen

15                    Dimetilformamida                    1,4 % en volumen

en agua corriente

El pH se ajusta a 7,3 con NaOH

Se añade una gota del antiespumante P-2000 a cada matraz antes de tratarlos en autoclave.

20                    Se prepara una solución de tiosulfato sódico disolviendo 6,25 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de agua destilada. Esta solución se esteriliza por filtración y después se añaden 0,5 ml de la misma a cada uno de los matraces de producción después de tratados en autoclave.

25                    Los 10 matraces de producción (que totalizan 400 ml)

21 OCT 1953



1 se incuban entonces durante 5 días a 28°C y se cosechan.

Aislamiento de FR-02A

5 Se reúne el contenido de los 10 matraces, se reduce el pH a 5,5 con ácido clorhídrico y el micelio y la materia nutriente suspendida se separan del caldo de fermentación por filtración. El filtrado se mezcla con 500 ml de cloroformo y se agita durante media hora. Después la mezcla se centrifuga para separar las fases y se desprecia la fase acuosa. La capa de cloroformo se seca sobre sulfato magnésico anhidro y el disolvente se evapora a vacío. El residuo se lava con 30 ml de hexano y se seca al aire para obtener el antibiótico FR-02A.

10

Propiedades físicas

15

El análisis elemental de FR-02A es el siguiente:

- C, 60,98 %
- H, 7,60 %
- N, 2,60 %

20

La fórmula empírica es  $C_{59}H_{90-96}N_2O_{21}$ . Esta concuerda en general con un peso molecular de 1.168 aproximadamente, obtenido por espectrometría de masas.

25

El FR-02A en forma de sal amónica es soluble en alcohol y cloroformo. Es moderadamente soluble en agua a pH 7,0 o mayor. Un espectro ultravioleta de la sal amónica en agua presenta las siguientes bandas:

---



1  $\lambda_{\max}$  233 nm;  $E_1^1 \%$  cm = 320  
 $\lambda_{\max}$  328 nm;  $E_1^1 \%$  cm = 180

Para el FR-02A,  $\epsilon = 19 \times 10^3$ .

5 Se obtuvo el espectro de resonancia magnética nuclear del antibiótico FR-02A a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Las características representativas del espectro eran dobletes a 1,21, 1,31 y 4,63  $\tau$  y un singlete a 4,87  $\tau$ .

10 La Figura 1 muestra el espectro de absorción infrarrojo del antibiótico FR-02A en un mull de Nujol. El FR-02A presenta una absorción característica en la región infrarroja del espectro a las siguientes longitudes de onda, expresadas en centímetros recíprocos:

15 Banda ancha a: 3400  
Bandas intensas a: 1640, 1460, 1380, 1080, 1020.  
Bandas prominentes a: 1550, 1505, 1240, 1195, 940,  
860, 720, 620.

El FR-02A se somete a varios métodos analíticos y los resultados se encuentran a continuación:

- 20
1. Columna de LH-20 en MeOH ( $\text{NH}_4$  + sales cargados)  $K_D = 0,302$
  2. Columna de XAD-2, 50 % iPrOH- $\text{H}_2\text{O}$  - emergencia (ácidos libres cargados) V.D. = 3,5 a 4,0
  3. Cromatografía en capa fina de gel de sílice,  $\text{CHCl}_3$  - MeOH -  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado 80:20:1  $R_f = 0,344$
  - 25 4. Cromatografía en papel, isopropanol, regulador de fosfato, pH 6,0 (0,01M), 70-30  $R_f = 0,9$



1 El FR-02A es un material prácticamente puro como  
puede deducirse del hecho de que forma una mancha única en  
cromatografía en capa fina y solo se detecta un perfil en  
forma de curva de Gauss en la exploración refractométrica  
5 de las columnas analíticas de LH-20 y XAD-2. Para caracteri-  
zar mejor el FR-02A in vitro, se obtuvieron los valores de  
la actividad del mismo utilizando un perfil del espectro  
antibiótico. El ensayo implica las aplicaciones de una gota  
del antibiótico de aproximadamente 0,015 ml sobre la super-  
10 ficie de placas de ágar complejo sembradas. El FR-02A se di-  
suelve en metanol al 10 % que por sí mismo no produce zonas  
de inhibición. Los resultados se encuentran en la Tabla I en  
forma de milímetros de las zonas de inhibición.

TABLA I

15 Perfiles del espectro antibiótico (PEA) del FR-02A en ensayos  
de difusión en ágar

	<u>Diámetros (mm) de las zo-</u> <u>nas de inhibición</u>
<u>Organismo, MB n°</u>	<u>FR-02A, 1 mg/ml</u>
20 <u>Bacillus sp. 633</u>	18
<u>Proteus vulgaris 1012</u>	10
<u>Pseudomonas aeruginosa 979</u>	10 T
<u>Serratia marcescens 252</u>	10 T
<u>Staphylococcus aureus 108</u>	11
25 <u>Bacillus subtilis 964</u>	19





1 El antibiótico FR-02A in vivo presenta poca toxicidad y un amplio espectro de actividad antibacteriana cuando se ensaya en ratones. Como ejemplo, se presentan los resultados para una bacteria Gram-negativa y una bacteria Gram-positiva, en la Tabla II.

5

TABLA II  
Resultados de ensayos in vivo con FR-02A<sup>\*</sup> en ratones

<u>Organismo</u>	<u>Infección</u>		<u>Terapia</u>		<u>Toxicidad<sup>**</sup></u>	
	<u>Vía</u>	<u>Vía</u>	<u>DE<sub>50</sub></u>	<u>Tolerado</u>	<u>Tóxicos</u>	
10 <u>Proteus vulgaris</u>	IP	IP	1,73	5,0	5,0	
<u>Strep. pyogenes</u>	IP	IP	0,247	1,25	5,0	

\* Los valores en la tabla están expresados en mg/ratón. Tanto las infecciones como las dosis terapéuticas de FR-02A fueron administradas intraperitonealmente. El FR-02A fué administrado en el momento de la infección y de nuevo 6 horas más tarde.

15

\*\* Los estudios de toxicidad del FR-02A en ratones no infectados indican que dos dosis de 2,5 mg/ratón, a una distancia de 6 horas, son toleradas; pero una dosis superior, v.g. de 5 a 10 mg/ratón, es tóxica.

20

25

1                    En resumen, la patente de invención que se solicita, deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

5                    1. Un método de producción del antibiótico FR-02A que consiste en cultivar el microorganismo Streptomyces lactam-  
durans en un caldo de fermentación que contiene un medio constituido por fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, bajo condiciones aerobias, hasta que se ha producido una cantidad importante de FR-02A y extraer -  
10                    el caldo completo, el caldo separado de los sólidos o los sólidos separados del caldo, con un disolvente orgánico polar no miscible con agua para obtener el antibiótico FR-02A que después puede ser purificado.

15                    2. Un método según la Reivindicación 1, donde el medio está prácticamente exento de materia nutriente en suspensión.

3. Un método según la Reivindicación 1, donde el medio contiene materia nutriente en suspensión.

20                    4. Un método según la Reivindicación 2, donde el micelio del caldo es separado de este último antes de extraer el caldo con un disolvente orgánico polar, no miscible con agua, para obtener el antibiótico FR-02A.

25                    5. Un método según la Reivindicación 2, donde el micelio es separado del caldo y extraído con un disolvente orgánico polar para obtener el antibiótico FR-02A.

- 1                   6. Un método según la Reivindicación 3, donde la materia suspendida en el caldo se separa de este último antes de extraer el caldo con un disolvente orgánico polar, no miscible con agua, para obtener el antibiótico FR-02A.
- 5                   7. Un método según la reivindicación 1, - que consiste en cultivar el microorganismo Streptomyces lactamdurans en un caldo de fermentación que contiene un medio que contiene materia nutriente en suspensión, comprendiendo dicho medio fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones aerobias, hasta que se produce una cantidad importante de FR-02A, separar los sólidos del caldo y extraer los sólidos con un disolvente orgánico polar para obtener el antibiótico FR-02A.
- 10
8. Un método según la Reivindicación 1, donde el disolvente orgánico polar no miscible con agua es un éster alquílico inferior de un ácido alcanoico inferior, una cetona o un hidrocarburo inferior halogenado.
- 15
9. Un método según la Reivindicación 7, donde el disolvente orgánico polar es un éster alquílico inferior de un ácido alcanoico inferior, una cetona o un hidrocarburo inferior halogenado.
- 20
10. Un método según la Reivindicación 8, donde el disolvente es un disolvente orgánico polar, no miscible con agua, seleccionado entre el grupo formado por formiato de metilo, formiato de etilo, acetato de metilo, acetato de etilo,
- 25

- 1 acetato de n-butilo, acetato de isobutilo, propionato de etilo, ciclohexanona, cloroformo, cloruro de metileno, tetracloruro de carbono, dicloruro de etileno, 1-cloro-2,2-dimetilpropano, tetracloroetileno y bromoformo.
- 5 11. Un método según la Reivindicación 9, donde el disolvente es un disolvente orgánico polar seleccionado entre el grupo formado por formiato de metilo, formiato de etilo, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de n-butilo, acetato de isobutilo, propionato de etilo, acetona, metil-
- 10 etil-cetona, ciclohexanona, cloroformo, cloruro de metileno, tetracloruro de carbono, dicloruro de etileno, 1-cloro-2,2-dimetilpropano, tetracloroetileno y bromoformo.
12. Un método según la Reivindicación 1, donde el antibiótico FR-02A es recuperado en forma prácticamente pura.
- 15 13. Un método según la Reivindicación 7, donde el antibiótico FR-02A es recuperado en forma prácticamente pura.
14. Un método según la Reivindicación 1, donde el antibiótico FR-02A se obtiene en forma prácticamente pura
- 20 por cromatografía sobre tamices moleculares, seguido de cromatografía sobre un agente adsorbente tensoactivo.
15. Un método según la Reivindicación 7, donde el antibiótico FR-02A se obtiene en forma prácticamente pura por cromatografía sobre tamices moleculares, seguido de cromatografía sobre un agente adsorbente tensoactivo.
- 25 16. Un método según la Reivindicación 1, donde el

1 - medio nutriente acuoso contiene aproximadamente entre 1 % y  
6 % en peso de hidratos de carbono y aproximadamente entre  
0,2 % y 6 % en peso de nitrógeno disponible.

5 17. Un método según la Reivindicación 7, donde el  
medio nutriente acuoso contiene aproximadamente entre 1 % y  
6 % en peso de hidratos de carbono y aproximadamente entre  
0,2 % y 6 % en peso de nitrógeno disponible.

10 18. Un método según la Reivindicación 1, donde  
la fermentación se lleva a cabo a una temperatura compendi-  
da entre 26° y 30°C aproximadamente y durante un periodo de  
unos 2 a 5 días.

15 19. Un método según la Reivindicación 7, donde la  
fermentación se lleva a cabo a una temperatura comprendida en-  
tre 26° y 30°C aproximadamente y durante un periodo de unos  
2 a 5 días.

20 20. Un método según la Reivindicación 1, donde el  
pH del medio nutriente acuoso está comprendido aproximadamente  
entre 6,0 y 8,0.

20 21. Un método según la Reivindicación 7, donde el  
pH del medio nutriente acuoso está comprendido aproximadamen-  
te entre 6,0 y 8,0.

25 22. Un método según la Reivindicación 1, donde el  
microorganismo es Streptomyces lactamdurans NRRL 3802.

25 23. Un método según la Reivindicación 7, donde el  
microorganismo es Streptomyces lactamdurans NRRL 3802.

1                    24. Se reivindica por último como objeto sobre el  
que ha de recaer la patente de Invención que se solicita:  
UN METODO DE PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO FR-02A.

5                    Todo conforme queda descrito y reivindicado en la  
presente memoria descriptiva que consta de cuarenta y cinco  
páginas mecanografiadas, y dibujos adjuntos.

Madrid, 21 de Octubre de 1.974

BERNARDO UNGRIA

10

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'B. Ungria', written over the printed name 'BERNARDO UNGRIA'. The signature is stylized and cursive.

15

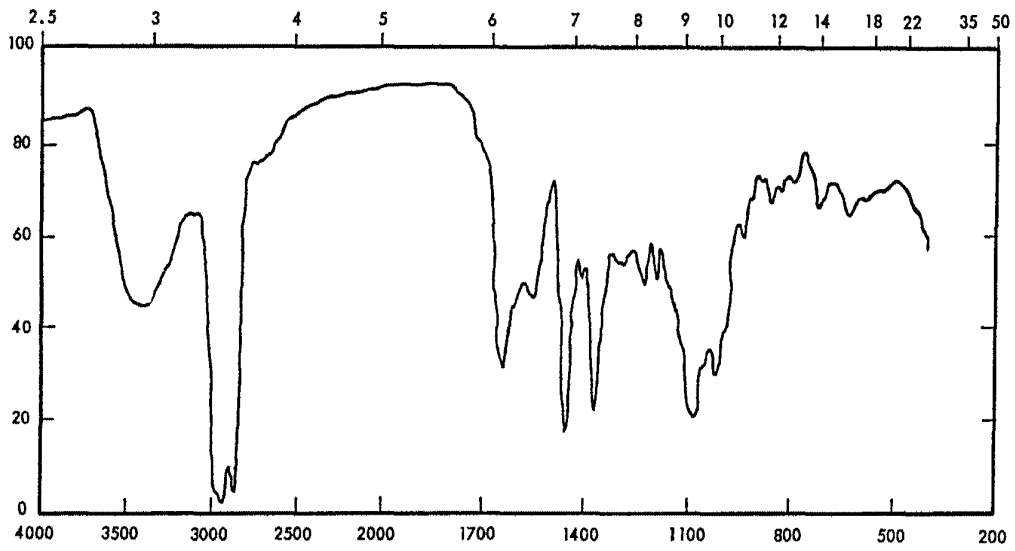
20

25



21 OCT 1974

FIG. 1



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 21 de Octubre de 1.974  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.