



(10) ES	(11) NUMERO 435.618	(10) A 1
(22)	FECHA DE PRESENTACION 14-3-75	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO 464.007	(32) FECHA 25-4-74	(33) PAIS ESTADOS UNIDOS
---	-----------------------	-----------------------------

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C 12D//AG1K	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	---	--

(64) TITULO DE LA INVENCION MEJORAS INTRODUCIDAS EN UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE CEFALMICINA C.
--

(71) SOLICITANTE (S) MERCK & CO., INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New Jersey, Estados Unidos.

(72) INVENTOR (ES) EDWARD INAMINE; JEROME BIRNBAUM.
--

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1

RESUMEN DE LA INVENCION

Se obtienen mayores rendimientos del conocido y útil antibiótico cefamicina C [ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivale-ramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico] por adición de D-lisina o DL-lisina a medios de fermentación constituidos por nutrientes orgánicos complejos o químicamente definidos.

5

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un procedimiento mejorado de fermentación para la producción del conocido y útil antibiótico cefamicina C [ácido 7-(D-5-amino-5-carboxivaleramido)-3-(carbamoiloximetil)-7-metoxi-3-cefem-4-carboxílico]. [Antimicrobial Agent and Chemotherapy, Vol. 2, Septiembre 1972, págs. 121-131, 132-135, 281-286 y 287-290]. En particular, esta invención se refiere a un método mejorado para la producción del antibiótico por fermentación de medios nutrientes con variedades adecuadas de microorganismos como, por ejemplo, Streptomyces.

10

15

20

25

30

El antibiótico es producido durante la fermentación aerobia de medios nutrientes acuosos adecuados, bajo condiciones controladas. Son adecuados los medios acuosos como los empleados para la producción de otros antibióticos. Estos medios contienen fuentes de carbono y nitrógeno que son asimilables por el microorganismo y sales inorgánicas. Además, los medios de fermentación contienen trazas de metales necesarios para el crecimiento del microorganismo, que son comúnmente proporcionadas como impurezas incidentales de los otros constituyentes del medio. En general, pueden utilizarse hidratos de carbono como azúcares, por ejemplo sacarosa, maltosa, fructosa, lactosa y similares y almidones como granos, por ejem-

1 plo avena y centeno, almidón de maíz, harina de maíz y simi-
lares, sólo o en combinación, como fuentes de carbono asimila-
ble. La cantidad exacta de la fuente o fuentes de hidratos
5 de carbono utilizadas en el medio dependerá en parte de los
otros ingredientes. Sin embargo, se ha encontrado que es su-
ficiente una cantidad del hidrato de carbono comprendida apro-
ximadamente entre 1 y 6 % del peso del medio. Puede utilizar-
se una sola fuente de carbono o pueden combinarse varias
fuentes de carbono.

10 Las fuentes de nitrógeno satisfactorias comprenden
miriadas de materias protéicas tal como diversas formas de
hidrolizados de caseína, harina de soja, licor de infusión de
maíz, solubles de destilería, productos de levadura, pasta
15 de tomate y similares. Las diversas fuentes de nitrógeno pue-
den ser utilizadas solas o en combinación y se emplean en can-
tidades que oscilan entre 0,2 y 6 % del peso del medio acuoso.

20 La fermentación se realiza a temperaturas comprendi-
das entre 20° y 37°C; sin embargo, para obtener resultados
óptimos, es preferible efectuar la fermentación a temperatu-
ras comprendidas entre unos 24°C y 32°C. El pH de los medios
nutrientes adecuados para desarrollar los cultivos de Strepto-
myces y producir el antibiótico debe estar comprendido entre
6,0 y 8,0 aproximadamente.

25 La cefamicina C es producida durante la fermentación
aerobia antes descrita por una cepa de Streptomyces lactandu-
rans. y Streptomyces clavuligerus capaz de producir dicho
compuesto como, por ejemplo, por las cepas depositadas en la
colección de cultivos de Northern Utilization Research and
Development Branch del Departamento de Agricultura de Estados
30 Unidos en Peoria, Illinois, bajo los números de accesoión

1 NRRL 3802 y NRRL 3585, respectivamente. También pueden uti-
lizarse otras cepas de esta especie, tales como los mutantes
obtenidos por agentes de mutación o aislados de la naturale-
za.

5 La cefamicina C y sus sales presentan resistencia no
solo a la penicilinasa sino también a las cefalosporinasas.
Este compuesto presenta actividad de inhibición del creci-
miento de los microorganismos gram-positivos y gram-negativos.
10 A diferencia de la cefalosporina C que tiene una actividad
antibacteriana relativamente baja, la cefamicina C presenta
un notable efecto gram-negativo in vivo con una potencia que,
en general, es superior a la de la cefalotina. Esta actividad
incluye la eficacia contra las siguientes bacterias gram-
negativas: Escherichia coli, Proteus vulgaris, Proteus
15 mirabilis, Salmonella schottmuelleri, Klebsiella pneumoniae
AD, Klebsiella pneumoniae B y Paracolonbacterium arizonae.

Los bioensayos del antibiótico se realizan por un pro-
cedimiento de disco-placa, utilizando discos de papel de fil-
tro de 3/8" (9,5 mm) de acuerdo con el procedimiento descrito
20 en las patentes estadounidenses 3,769.169 y 3.770.590, cuyo
contenido se incorpora aquí por referencia. Las placas de en-
sayo se preparan utilizando agar nutriente Difco más 2,0 g/l
de extracto de levadura Difco a razón de 10 ml por placa. Un
crecimiento durante la noche del organismo ensayado, Vibrio
25 percolans ATCC 8461, se diluye en solución salina estéril pa-
ra dar una suspensión con un 40 % de transmitancia a una lon-
gitud de onda de 660 mμ. Esta suspensión se agrega a 20 ml/li-
tro de medio antes de verter las placas.

30 Las placas de ensayo se mantienen a 4°C hasta que se
utilizan (5 días como máximo). Después de la aplicación de los

1 discos de ensayo saturados de antibiótico, las placas se in-
cuban a 28°C durante un periodo de 8 a 24 horas. Las zonas
de inhibición se leen en mm de diámetro. Se utilizan para de-
terminar las potencias relativas o, cuando se comparan con un
5 patrón de referencia purificado, la potencia en µg/ml.

Debido a la dificultad inherente a la separación de
cefamicina C pura de las grandes cantidades de impurezas con-
tenidas en el caldo de fermentación, es de considerable im-
portancia encontrar una forma de aumentar la concentración
10 del antibiótico con respecto a los sólidos totales del caldo.

Por lo tanto, un objeto de esta invención es propor-
cionar un método para aumentar el rendimiento de antibiótico
en un proceso de fermentación. Otro objeto de la invención es
proporcionar un método para aumentar el rendimiento de un an-
15 tibiótico utilizando en el proceso de fermentación aditivos
químicos relativamente baratos y fácilmente asequibles. Otros
objetos de la invención resultarán evidentes en lo que sigue.
Se ha descubierto que la adición de D-lisina o DL-lisina a
los medios de fermentación orgánicos complejos y químicamente
20 definidos aumenta la producción de cefamicina C.

Por medios "orgánicos complejos" se entienden los me-
dios donde algunos de los ingredientes no están químicamente
definidos. Un ejemplo de estos medios es el constituido por
25 avena de la marca Crescent, harina de soja, citrato sódico,
un antiespumante y solubles de destilería. Por medios "quími-
camente definidos" o "sintéticos" se entienden los medios en
los que todos los ingredientes están químicamente definidos.
Un ejemplo de estos medios es el constituido por glucosa, fos-
fato ácido potásico, citrato sódico, asparagina, metionina,
30 glutamato monosódico, cloruro cálcico, sulfato magnésico y

1 sulfato férrico.

La cantidad de D-lisina o DL-lisina necesaria para estimular la producción del antibiótico depende hasta cierto punto del cultivo y del medio empleado. En el caso del cultivo de Streptomyces lactamdurans o Streptomyces clavuligerus, se ha observado un aumento de la producción del antibiótico en medios sintéticos que contienen de 0,01 a 0,80 % (peso/volumen) de cualquiera de los dos aditivos. Se obtienen rendimientos óptimos a un nivel de 0,10 a 0,80 % con rendimientos especialmente buenos a 0,40 %.

Correspondientemente, en un medio nutriente orgánico complejo que utiliza Streptomyces lactamdurans o Streptomyces clavuligerus, se observa un aumento de los rendimientos de antibiótico a un nivel de 0,05 a 0,20 % de D-lisina o DL-lisina, obteniéndose los rendimientos óptimos a 0,10-0,20 %.

El experto en la técnica observará fácilmente que, además de ser utilizadas por sí solas, la D-lisina y la DL-lisina pueden ser combinadas para dar un aditivo que estimulará el rendimiento de la cefamicina C tanto en los medios nutrientes orgánicos complejos como en los medios sintéticos que utilizan S. lactamdurans o S. clavuligerus.

El experto en la técnica observará además que, además de emplear D-lisina y DL-lisina, pueden utilizarse en la práctica de la invención las sales de estos materiales. Por ejemplo, pueden utilizarse el hidrocloreuro, sulfato, fosfato, etc. en el medio de producción basal para aumentar el rendimiento de antibiótico.

El momento de la adición de los aditivos que aumentan el rendimiento al caldo de fermentación no es crítico. Así, la adición puede tener lugar en el momento de la inoculación

1 con el cultivo de *Streptomyces* e incluso hasta 72 horas des-
pués. En general, se prefiere añadir la D-lisina o la DL-lisi-
na en el momento de la inoculación.

5 Los medios a los cuales se añade el compuesto D-lisi-
na o DL-lisina pueden ser cualquier medio nutriente acuoso
adecuado; sin embargo, cuando ciertos medios se utilizan en
combinación con estos aditivos dan cantidades especialmente
altas del antibiótico. Así, se ha encontrado que el cultivo
de *Streptomyces clavuligerus* proporciona los máximos rendi-
10 mientos en los siguientes medios:

MEDIO I

Almidón - 4,8 %

Solubles de destilería - 0,5 %

Sémola de semilla de soja - 0,21 %

15 Glicerol - 0,8 %

Caseína hidrolizada (^{*}N-Z Amine Tipo A) - 0,5 %

Heptahidrato de sulfato ferroso - 0,01 %

Agua corriente - 1,0 litros.

20 ^{*}N-Z Amine, Tipo A: digesto enzimático de caseína; producto
de la Sheffield Chemical Co., Norwich, New York.

El cultivo de *Streptomyces lactandurans* da rendimien-
tos especialmente buenos de antibiótico en el siguiente Me-
dio II.

MEDIO II

25 Solubles de destilería - 3,0 %

Levadura seca primaria - 1,0 %

Antiespumante Mobile par-S - 0,25 %

Glicina - 0,05 %

30 L-fenilalanina - 0,30 %

1 Almidón de maíz - 2,0 %
Agua desionizada - 1,0 litros.

5 La discusión anterior y los ejemplos que siguen están dirigidos fundamentalmente a las fermentaciones que utilizan una cepa particular de los cultivos Streptomyces lactamdurans y Streptomyces clavuligerus. Sin embargo, también pueden ser utilizadas otras cepas de estos organismos, como los mutantes, para producir el antibiótico y resultará evidente al experto en la técnica que la DL-lisina o la
10 D-lisina pueden ser utilizadas para aumentar el rendimiento del antibiótico cuando se agregan a lotes de fermentación que contienen estas cepas. Siguiendo las enseñanzas de esta invención, las modificaciones o variaciones obvias de los niveles óptimos del aditivo o del momento de adición al medio de fermentación, etc., están dentro del alcance del experto en la técnica, cualquiera que sea la cepa de Streptomyces lactamdurans o Streptomyces clavuligerus utilizada para producir el antibiótico cefamicina C.

20 Aunque el antibiótico es producido en cultivos superficiales y sumergidos, actualmente se prefiere efectuar la fermentación en estado sumergido. Las fermentaciones a pequeña escala se realizan convenientemente colocando cantidades adecuadas de medio nutriente en matraces, esterilizando los matraces y su contenido por calentamiento a 120°C, inoculando los matraces con esporas o un cultivo celular vegetativo de una cepa productora de cefamicina C de Streptomyces
25 tapando sin apretar el cuello de los matraces con algodón y permitiendo que la fermentación transcurra a una temperatura constante de 28°C aproximadamente, en un sacudidor, durante
30 3-5 días. Para el trabajo a mayor escala, es preferible

1 efectuar la fermentación en tanques adecuados provistos de
un agitador y un medio para airear el medio de fermentación.
En este método, el medio nutriente se prepara en el tanque y
se esteriliza calentándolo a 120°C. Después de enfriar el
5 medio esterilizado, es inoculado con una fuente adecuada de
cultivo celular vegetativo de Streptomyces y se permite que
transcurra la fermentación durante 2-4 días mientras se agita
y/o airea el medio nutriente y se mantiene la temperatura a
unos 28°C. Este método de producción de cefamicina C es espe-
10 cialmente adecuado para la preparación de grandes cantidades
del antibiótico.

La fermentación utilizando el microorganismo produc-
tor de cefamicina C puede ser llevada a cabo a temperaturas
comprendidas aproximadamente entre 20 y 37°C. Sin embargo,
15 para obtener resultados óptimos, es más conveniente efectuar
la fermentación a temperaturas comprendidas entre 26 y 30°C.
El pH de los medios nutrientes adecuados para cultivar el
Streptomyces y producir el antibiótico puede variar entre 5 y
9 aproximadamente. Sin embargo, el intervalo de pH preferido
20 es alrededor de 6,0 a 7,5.

En la puesta en práctica de la invención, se prepara
una suspensión celular por adición de medio estéril a un cul-
tivo inclinado en agar del microorganismo productor de cefa-
micina C. El crecimiento del cultivo inclinado se utiliza des-
25 pués para inocular un matraz de siembra y este último se sa-
cude a unos 28°C durante 1-3 días para obtener un buen creci-
miento. Después el matraz de siembra se utiliza para inocu-
lar los matraces de producción. Alternativamente, el matraz
de siembra puede ser inoculado mediante un cultivo liofiliza-
30 do o un inoculum congelado.

1 La inoculación generalmente se efectúa empleando alrededor de 1 ml por 40 ml de medio de producción. Entonces se
5 agrega la concentración deseada de aditivo a los matraces de producción después del periodo de espera necesario y se permite que transcurra la fermentación durante 2-4 días mientras
10 se agita y/o airea el medio nutriente y se mantiene la temperatura a unos 28°C. Todos los matraces de producción, es decir, los que contienen aditivos y los matraces utilizados como controles, son después analizados, generalmente al cabo de 96 horas, para determinar la cantidad de antibiótico producida en cada matraz.

15 El antibiótico es convenientemente analizado mediante un procedimiento de disco-placa, empleando Vibrio percolans ATCC 8461 como organismo de ensayo. Se utilizan discos de 3/8" (9,5 mm) de diámetro. La actividad del antibiótico se expresa en microgramos por mililitro del ácido libre. Se prepara una curva patrón a partir de soluciones de concentración conocida del antibiótico.

20 Después los matraces de producción se analizan diluyendo la muestra en solución reguladora de fosfato 0,02 M a pH 7, hasta una concentración apropiada. El organismo de ensayo es Vibrio percolans ATCC 8461 y el medio de ensayo es agar nutriente Difco más 0,2 % de extracto de levadura Difco.
25 Los discos se sumergen en 5 µg/ml de la solución patrón de antibiótico y se colocan sobre la placa en posición alterna con respecto a la muestra. Después las placas se incuban a 37°C durante 18 horas y se determinan los diámetros de las zonas en milímetros. Se emplean cinco placas patrón conteniendo cuatro niveles del patrón que oscila entre 2,5 µg/ml y
30 20 µg/ml. El ensayo se calcula mediante un nomograma y los

1 resultados se registran en microgramos por mililitro del ácido libre.

5 El antibiótico puede ser recuperado del medio de fermentación por diversos procedimientos. El caldo filtrado puede pasarse a través de una o más columnas cambiadoras de ión. El carácter anfótero del antibiótico permite la selección de resinas cambiadoras de ión catiónicas y aniónicas para optimizar la recuperación. El antibiótico adsorbido puede ser separado después por elución, preferiblemente en un disolvente volátil tal como piridina, que pueda ser fácilmente eliminado.

10 Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar y no para limitar la invención.

EJEMPLO 1

15 Se abre asépticamente un tubo liofilizado de S. lactamdurans NRRL 3802 y su contenido se transfiere a un tubo de cultivo inclinado con un medio de mantenimiento de agar de la siguiente composición:

20	Melazas finales de azúcar negro	1 %
	Levadura de destilería (National Yeast Co.)	1 %
	Bacto-agar (Difco)	2,5 %
	pH	7,0

25 Después de la inoculación, los tubos inclinados se incuban a 28°C durante 7 días, en cuyo momento se observa un crecimiento abundante. Los cultivos se almacenan a la temperatura del refrigerador hasta su empleo.

30 Siembra de primera fase: Se transfieren 4 ml del organismo desde el cultivo inclinado a 40 ml de un medio de siembra estéril de primera fase, contenidos en un Erlenmeyer de 250 ml con tabiques. El medio contiene 10 g/l de levadura seca pri-

1 maria N.F. (suministrada por Yeast Products Co., Paterson,
N.J.) en agua desionizada. El matraz se incuba a 28°C en un
sacudidor rotatorio (desplazamiento de 2 pulgadas, 5,1 cm)
5 colocado a 220 rpm, durante 48 horas, al cabo de las cuales
se observa un lujuriente crecimiento del organismo.

Siembra de segunda fase: Se utiliza 1 ml de la prime-
ra siembra para inocular 40 ml de autolizado de levadura
Fleishmann S-150 al 2 %, pH 7,0, contenido en un Erlenmeyer
de 250 ml con tabiques. Este nutriente es un producto de la
10 Fleischmann Yeast Co., Stamford, Connecticut. La siembra de
segunda fase se incuba en la forma antes descrita durante
48 horas.

Medio de producción basal: El medio de producción ba-
sal tiene la siguiente composición:

	<u>g/l</u>
Solubles de destilería (Brown & Forman Co.)	30
Levadura seca primaria (Yeast Products Co.)	7,5
Antiespumante Mobil Par-S	2,5
Tiosulfato sódico*	1,0
20 Agua desionizada hasta	1000 ml

* Añadido desde una solución de reserva concentrada esterili-
zada al cabo de 30 horas después de la inoculación.

El pH del medio se ajusta a 7,0 con pequeñas canti-
dades de solución de hidróxido sódico, se dispensan 40 ml en
25 Erlenmeyer de 250 ml y se esteriliza a 120°C durante 20 minu-
tos. Después de enfriar, el medio se inocula con un 2,5 % en
volumen de la siembra de segunda fase fermentada. La incuba-
ción se realiza durante 72 horas a 28°C en un sacudidor rota-
torio, como se ha descrito antes. Al cabo de 30 horas después
30 de la inoculación, se añade una pequeña cantidad de solución

1 concentrada estéril de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hasta un nivel final de 1,0 g/litro de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

5 A una serie de matraces, preparados como se ha descrito antes, se añade L-, D- o DL-lisina.HCl. Los matraces son idénticos en todos los aspectos a excepción de la presencia del aminoácido. La solución de lisina se prepara disolviendo L-, D- o DL-lisina.HCl en agua y neutralizando hasta pH 7,0 con solución de hidróxido sódico. Estas soluciones se esterilizan independientemente del medio de producción basal y se añaden partes alícuotas primero antes de la inoculación con el organismo de producción para dar una concentración final de 0,1 % en el caso de L- y D-lisina y del 0,2 % en el caso de DL-lisina.

15 Una vez completada la fermentación, las células se separan por centrifugación y el caldo clarificado se analiza para determinar la cefamicina C en la forma antes descrita.

TABLA I

Adiciones al medio de producción basal	Concentración (calculada como hidroclo ruo)	Producción de cefamicina C, ($\mu\text{g/ml}$)
20 Ninguna (control)	0	185
D-lisina	0,10 %	266
DL-lisina	0,20 %	299
L-lisina	0,10 %	150

EJEMPLO 2

25 Siembra de primera fase: Se abre asépticamente un tubo liofilizado de S. lactamdurans NRRL 3802 y su contenido se transfiere a 40 ml de un medio de siembra estéril de primera fase contenidos en un Erlenmeyer de 250 ml con tabiques. El medio contiene 10 g/l de levadura seca primaria, N.F. (suministrada por Yeast Products Co, Paterson, N.J.) en agua

30

1 desionizada. El matraz se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento 2 pulgadas, 5,1 cm) colocado a 220 rpm, durante 48 horas, en cuyo momento se observa un lujurioso crecimiento del organismo.

5 Siembra de segunda fase: Se utiliza 1 ml de la primera siembra para inocular 40 ml de medio conteniendo 1 % de autolizado de levadura Ardamine YEP (Yeast Products Co., N.J.) a pH 7,0, en un Erlenmeyer de 250 ml con tabiques. La incubación se realiza en un sacudidor rotatorio (desplazamiento 2 pulgadas, 5,1 cm, 220 rpm) a 28°C, durante 22 horas.

10 Medio de producción basal: El medio de producción basal tiene la siguiente composición:

	%
15 Solubles de destilería	3,0 peso/volumen
Levadura seca primaria N.F.	0,75 peso/volumen
Almidón de maíz (Clinton)	2,0 peso/volumen
Dimetilformamida	1,0 volumen/volumen
Glicina	0,05 peso/volumen
20 L-fenilalanina	0,3 peso/volumen
Antiespumante Mobil Par-S	0,25 peso/volumen
Tiosulfato sódico ^x	0,1 peso/volumen

25 ^x Agregado 30 horas después de la inoculación desde una solución de reserva concentrada estéril para dar la concentración final indicada.

30 El medio se prepara en agua desionizada, se ajusta a pH 7-7,5 con hidróxido sódico, se dispensan 40 ml en Erlenmeyer de 250 ml y se esteriliza en autoclave durante 20 minutos. Después de enfriar, el medio se inocula con 2,5 % en volumen de la siembra de segunda fase y se incuba durante 96 ho-

1 ras a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento 2 pul-
gadas, 5,1 cm) colocado a 220 rpm. El tiosulfato sódico se
agrega 30 horas después de la inoculación.

5 A una serie de matraces preparados como se ha descri-
to se añade L-, D- o DL-lisina.HCl. Los matraces son idénti-
cos en todos los aspectos salvo la presencia del aminoácido.
La solución de lisina se prepara disolviendo L-, D- o DL-lisina.HCl
10 en agua y neutralizando a pH 7,0 con solución de hidróxido
sódico. Estas soluciones se esterilizan independientemente
del medio de producción basal y se añaden partes alícuotas
primero antes de la inoculación con el organismo de produc-
ción para dar una concentración final de 0,05 a 0,2 % de hi-
drocloruro de L-, D-, o DL-lisina.

15 Una vez completada la fermentación, las células se
separan por centrifugación y el caldo clarificado se anali-
za para determinar la cefamicina C en la forma antes descri-
ta.

TABLA II

20	Adición al medio de producción ba sal	Concentración (calculada co mo hidrocloru ro)	Producción de cefamicina C µg/ml
	Ninguna (control)	0	131
	D-lisina	0,05 % 0,10 % 0,20 %	186 184 237
25	DL-lisina	0,05 % 0,10 % 0,20 %	169 157 187
	L-lisina	0,05 % 0,10 % 0,20 %	97 96 88

EJEMPLO 3

30 Siembra de primera fase: Se abre asépticamente un tu-

1 bo liofilizado de S. lactamdurans NRRL 3802 y su contenido se
transfiere a 40 ml de un medio de siembra estéril de primera
fase contenido en un Erlenmeyer de 250 ml con tabiques. El
5 medio contiene 10 g/l de levadura seca primaria N.F. (sumi-
nistrada por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua
desionizada. El matraz se incuba a 28°C en un sacudidor ro-
tatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5,1 cm) colocado a 220
rpm, durante 48 horas, en cuyo momento se observa un lujuriant
te crecimiento del organismo.

10 Siembra de segunda fase: Se utiliza 1 ml de la prime-
ra siembra para inocular 40 ml de un medio que contiene 1 %
de autolizado de levadura Ardamine YEP (Yeast Products, Co.,
N.J.) a pH 7,0, en un Erlenmeyer de 250 ml con tabiques. La
15 incubación se realiza en un sacudidor rotatorio (desplaza-
miento, 2 pulgadas, 5,1 cm; 220 rpm) a 28°C, durante 22 ho-
ras.

Medio de producción basal: El medio de producción ba-
sal tiene la siguiente composición:

	%
20 Solubles de destilería	3,0 peso/volumen
Levadura seca primaria N.F.	0,75 peso/volumen
Glicerol	1,0 peso/volumen
Dimetilformamida	1,0 volumen/volumen
Glicina	0,05 peso/volumen
25 L-fenilalanina	0,3 peso/volumen
Antiespumante Mobil Par-S	0,25 peso/volumen
Tiosulfato sódico*	0,1 peso/volumen

* Agregado 30 horas después de la inoculación desde una so-
30 lución de reserva concentrada estéril para dar la concen-
tración final indicada.

1 El medio se prepara en agua desionizada, se ajusta a
pH 7-7,5 con hidróxido sódico, se dispensan 40 ml en Erlenme-
yer de 250 ml y se esteriliza en autoclave durante 20 minu-
tos. Después de enfriar, el medio se inocula con 2,5 % en
5 volumen de la siembra de segunda fase y se incuba durante
96 horas a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento,
2 pulgadas, 5,1 cm) colocado a 220 rpm. El tiosulfato sódico
se agrega 30 horas después de la inoculación.

10 A una serie de matraces, preparados como se ha descri-
to antes, se añade L-, D-, o DL-lisina.HCl. Los matraces son
idénticos en todos los aspectos excepto la presencia del ami-
noácido. La solución de lisina se prepara disolviendo L-,
D- o DL-lisina.HCl en agua y neutralizando a pH 7,0 con so-
lución de hidróxido sódico. Estas soluciones se esterilizan
15 independientemente del medio de producción basal y se añaden
partes alícuotas primero antes de la inoculación con el orga-
nismo de producción para dar concentraciones finales de
0,05 % a 0,2 % de hidrocloreuro de L-, D- o DL-lisina.

20 Una vez completada la fermentación, las células se
separan por centrifugación y el caldo clarificado se anali-
za para determinar la cefamicina C en la forma antes descri-
ta.

TABLA III

25	Adición al medio de producción basal	Concentración (cal- culada como hidrocloro- ruro)	Producción de ce- famicina C (µg/ml)
	Ninguna (control)	0	151
	D-lisina	0,05 %	221
		0,10 %	274
		0,20 %	296

30

TABLA III (continuación)

Adición al medio de producción basal	Concentración (calculada como hidroclo- ruro)	Producción de cefamicina C (µg/ml)
DL-lisina	0,05 %	182
	0,10 %	198
	0,20 %	222
L-lisina	0,05 %	152
	0,10 %	143
	0,20 %	120

EJEMPLO 4

Siembra de primera fase: Se abre asépticamente un tubo liofilizado de S. lactamdurans NRRL 3802 y su contenido se transfiere a 40 ml del medio de siembra estéril de primera fase contenidos en un Erlenmeyer de 250 ml con tabiques. El medio contiene 10 g/l de levadura seca primaria N.F. (suministrada por Yeast Products Co., Paterson, N.J.) en agua desionizada. El matraz se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5,1 cm) colocado a 220 rpm, durante 48 horas, en cuyo momento se observa un lujuriente crecimiento del organismo.

Siembra de segunda fase: Se utiliza 1 ml de la primera siembra para inocular 40 ml de un medio sintético idéntico al medio de producción sintético descrito más adelante. La incubación se realiza en Erlenmeyers a 28°C colocados en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5,1 cm) colocado a 220 rpm, durante 48 horas.

Medio de producción sintético

	%
Glucosa	1,0
Glutamato monosódico	0,425
i-Inositol	0,02
Acido p-aminobenzóico	0,000001

		<u>%</u>
1	K_2HPO_4	0,2
	NH_4Cl	0,1
	$NaCl$	0,05
5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05
	$CaCO_3$	0,025
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0025
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,0005
10	$Na_2S_2O_3^*$	0,1

* Añadido desde una solución de reserva concentrada estéril 30 horas después de la inoculación para dar la concentración final indicada.

15 El medio se prepara con agua desionizada y se ajusta a pH 7,0 con hidróxido sódico y se esterilizan en autoclave durante 20 minutos unos Erlenmeyers de 250 ml que contienen 40 ml cada uno del medio.

20 Después de enfriar, cada matraz se inocula con 1,0 ml de la segunda siembra. La incubación se realiza durante 96 horas a 28°C en un sacudidor rotatorio. El tiosulfato sódico se agrega como se ha descrito antes 30 horas después de la inoculación. Se añade a los matraces L-, D- o DL-lisina .HCl desde soluciones de reserva independientemente esterilizadas, inmediatamente antes de la inoculación con el organismo, con
25 objeto de alcanzar varios niveles del aminoácido. Los análisis de la producción de antibióticos se realizan como se ha descrito anteriormente.

30

1

TABLA IV

<u>Adiciones al medio de producción basal sintético</u>	<u>Concentración (calculada como hidrócloruro)</u>	<u>Producción de cefamicina C (µg/ml)</u>
Ninguna (control)	0	80
5 D-lisina	0,01 %	102
	0,10 %	180
	0,20 %	219
	0,40 %	270
	0,80 %	251
DL-lisina	0,01 %	113
	0,10 %	140
	0,20 %	129
	0,40 %	148
	0,80 %	166
10 L-lisina	0,01 %	68
	0,10 %	112
	0,20 %	65
	0,40 %	83
	0,80 %	95

EJEMPLO 5

15

Siembra de primera fase: Se abre asépticamente un tubo liofilizado de Streptomyces clavuligerus NRRL 3585 y su contenido se transfiere a 40 ml de un medio con la siguiente composición:

20

	<u>%</u>
Glucosa	1,5
Harina de soja	1,5
Sólidos de licor de infusión de maíz	0,5
Carbonato cálcico	0,2
Cloruro sódico	0,5
25 Agua desionizada hasta	1000 ml

25

El pH de la solución se ajusta a 6,7 con hidróxido sódico, se dispensan 40 ml en Erlenmeyer de 250 ml con tabiques y se esteriliza a 120°C durante 20 minutos. El matraz inoculado se incuba a 28°C en un sacudidor rotatorio (desplazamiento, 2 pulgadas, 5,1 cm) colocado a 220 rpm, durante

30

1 48 horas, en cuyo momento se observa un intenso crecimiento del organismo.

Medio de producción basal: El medio de producción basal tiene la siguiente composición:

	<u>%</u>
5 Almidón de maíz (Clinton Corn Products)	4,8
Solubles de destilería	0,5
Harina de soja	0,1
Glicerol	0,8
10 Caseína hidrolizada (N-Z Amine, Tipo A)	0,5
Heptahidrato de sulfato ferroso	0,01
Tiosulfato sódico*	0,05
Agua corriente hasta	1000 ml

15 * Agregado al iniciarse la fermentación desde una solución de reserva concentrada estéril para dar la concentración final indicada.

20 La solución se ajusta a pH 6,5 con hidróxido sódico, se dispensan 40 ml en Erlenmeyers de 250 ml y se esteriliza durante 20 minutos a 120°C. Después de enfriar el medio, se añade tiosulfato sódico en la forma antes descrita y los matraces se inoculan con 2,5 % en volumen de la fase de siembra. La incubación se realiza durante 96 horas a 28°C en un sacudidor rotatorio, como se ha descrito antes.

25 Como en el Ejemplo 4 anterior, varios matraces reciben D- o DL-lisina.HCl. La producción de antibiótico se analiza como se ha descrito anteriormente.

30

1

TABLA V

Adición al medio de producción basal	Concentración (calculada como hidrócloruro)	Producción de cefamicina C, equivalentes ($\mu\text{g/ml}$)
Ninguna (control)	0	663
5 D-lisina	0,05 %	771
	0,10 %	848
DL-lisina	0,05 %	784
	0,10 %	765

10

Considerando los ejemplos 1-5 resulta evidente que la D-lisina y la DL-lisina estimulan espectacularmente la producción del antibiótico cefamicina C, mientras que la L-lisina no lo hace. De hecho, la L-lisina puede ser considerada concebiblemente como ligeramente inhibitoria cuando se agrega a medios de producción complejos a niveles mas altos. La estimulación de la producción del antibiótico de β -lactama cefamicina C por los aminoácidos "no naturales" D- y DL-lisina constituye un fenómeno único e inesperado.

15

Cualquier desviación de la descripción anterior que se adapte a este invento se considera incluida dentro de los límites de las reivindicaciones.

20

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

REIVINDICACIONES

25

1. Mejoras introducidas en un procedimiento de preparación de cefamicina C por cultivo de una especie productora de cefamicina C de Streptomyces en un medio nutriente, caracterizadas dichas mejoras porque comprenden la adición de D-lisina o DL-lisina a un medio nutriente.

30

2. Mejoras según la reivindicación 1, donde la especie de Streptomyces está seleccionada entre el grupo formado por Streptomyces lactamdurans o Streptomyces clavuligerus.

1 3. Mejoras según la reivindicación 2, donde el medio nutriente es sintético.

5 4. Mejoras según la reivindicación 3, donde la D-lisina o la DL-lisina se agrega en la proporción de aproximadamente 0,01 a 0,80 % (peso/volumen) del medio sintético, calculada como hidrocioruro.

 5. Mejoras según la reivindicación 4, donde el organismo es Streptomyces lactamdurans.

10 6. Mejoras según la reivindicación 4, donde el organismo es Streptomyces clavuligerus.

 7. Mejoras según la reivindicación 4, donde el aditivo es D-lisina.

 8. Mejoras según la reivindicación 4, donde el aditivo es DL-lisina.

15 9. Mejoras según la reivindicación 2, donde el medio nutriente es un medio nutriente orgánico complejo.

20 10. Mejoras según la reivindicación 9, donde la D-lisina o la DL-lisina es añadida en la proporción de aproximadamente 0,05 a 0,20 % (peso/volumen) del medio nutriente orgánico complejo, calculada como hidrocioruro.

 11. Mejoras según la reivindicación 10, donde el organismo es Streptomyces lactamdurans.

25 12. Mejoras según la reivindicación 10, donde el organismo es Streptomyces clavuligerus.

 13. Mejoras según la reivindicación 10, donde el aditivo es D-lisina.

 14. Mejoras según la reivindicación 10, donde el aditivo es DL-lisina.

30 15. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita por:

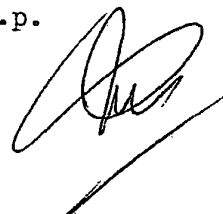
1 MEJORAS INTRODUCIDAS EN UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE
CEFAMICINA C.

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de veinticuatro pá-
ginas mecanografiadas.

Madrid 14 de marzo de 1975

BERNARDO UNGRIA

P.P.



10

15

20

25

30