

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.



PATENTE DE INVENCION

19 ES	11 NUMERO 436.104	13 A 1
	21	
	22 FECHA DE PRESENTACION 26.3.75	

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO 13356/74	32 FECHA 28.3.74	33 PAIS Gran Bretaña
--	---------------------	-------------------------

CONCEDIDA
10 DIC. 1975

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D;AG1K	62 PATENTE DE LA QUE ES DEPENDENCIA
------------------------	---	-------------------------------------

69 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA SAL SUSTANCIALMENTE PURA DE UN COMPUESTO ACIDO CARBOXILICO ANTIBACTERIALMENTE ACTIVO

71 SOLICITANTE (ES)
BEECHAM GROUP LIMITED

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Beecham House, Great West Road, BRENTFORD, Middlesex, Inglaterra

72 INVENTOR (ES)
Dennis Sutterworth, Martin Cole, John Dick Hood, británicos, los cuales han cedido sus derechos a la Cia. solicitante.

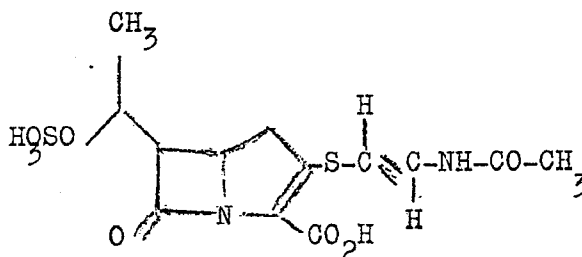
73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOLBURU

**POOR
QUALITY**

1 nominado aquí MM 13902 y sus sales.

El MM 13902 es un ácido carboxílico sólido de fórmula I



10 que en forma de sal sódica prácticamente pura, tiene las siguientes características:

i Es muy soluble en agua, soluble en metanol y prácticamente insoluble en cloroformo, éter dietílico o hidrocarburos.

15 ii. En solución acuosa, presenta un espectro ultravioleta característico, con máximos de absorción, uno de los cuales se encuentra a 305 mμ aproximadamente.

20 iii. Cuando está presente al 0,4% en peso/peso en un disco de KBr recién preparado, presenta un espectro infrarrojo característico con máximos de absorción, entre otros, en 3450, 2950, 1750, 1620, 1510, 1400 y 1260 cm⁻¹. aprox.

25 iv. Tiene un espectro RMN característico cuando se toma en D₂O, cuyo espectro presenta entre otros: (a) una pareja de dobletes de campo bajo centrados a aproximadamente 2,85τ y 4,00τ, con constantes de copulación de aproximadamente 14 Hz (b) un doblete centrado aproximadamente en 8,55τ y (c) un singlete marcado en 8,00τ aproximadamente.

30 v. Posee actividad antibacteriana contra diversas especies, entre otras las siguientes: cepas de Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Klebsiella aerogenes, Proteus mirabilis, Salmonella typhi y Pseudomonas aeruginosa.

1 vi. Cuando se mezcla con ampicilina, sinergiza su actividad contra organismos que comprenden las cepas Escherichia coli, Klebsiella aerogenes, Proteus mirabilis, Proteus morgani y Staphylococcus aureus Russell.

5 La sal disódica pura de MM 13902 es un inhibidor de la β -Lactamasa y tiene un I_{50} (definido más adelante) comprendido entre 0,001 $\mu\text{g/ml}$ y 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ contra la β -lactamasa de Escherichia coli B 11.

10 Cuando se hace pasar sobre celulosa en un sistema de cromatografía en capa fina, la sal disódica pura de MM 13902 tiene los siguientes valores R_f aproximados:

(a) n-butanol/isopropanol/agua - 7:7:6 v/v; $R_f = 0,72$

(b) isopropanol/agua - 7:3 v/v; $R_f = 0,85$

(c) n-butanol/etanol/agua - 7:7:6; $R_f = 0,81$

15 (d) n-propanol/agua - 4:1; $R_f = 0,75$

20 Desde otro punto de vista, el MM 13902 puede ser caracterizado como agente antibacteriano que contiene azufre. cuyas sales se producen durante el cultivo del Streptomyces Oliva ceus ATCC 31126 y en forma de una solución acuosa de su sal disódica tiene unos máximos de absorción ultravioleta a 305 nm aproximadamente y 225 nm aproximadamente, esencialmente como muestra la Figura 1 dada aquí.

25 Alternativamente, el MM 13902 puede ser caracterizado como un agente antibacteriano que, en forma de su sal disódica prácticamente pura, presenta un espectro de absorción infrarrojo sustancialmente como el mostrado en la Figura 2, cuando se recoge en su disco de KBr al 0,4 % en peso/peso reciente preparado y que, en forma de su sal disódica prácticamente pura, tiene un espectro RMM esencialmente como el mostrado en la Figura 3 cuando se recoge en solución de D_2O reciente preparado.

30

1 El material MM 13902 suele ser inestable cuando se encuentra en la forma ácida no salificada. Por consiguiente, un aspecto preferido de esta invención proporciona las sales de MM 13902. Adecuadamente, las sales de MM 13902 son sales dibásicas. Mas adecuadamente, estas sales son transformadas con iones farmacéuticamente aceptables como iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, amonio convencionalmente sustituido y similares. Son sales especialmente adecuadas las sales de metales alcalinos como las de sodio o potasio, por ejemplo las sales disódica o dipotásica.

5 Adecuadamente, el MM 13902 y sus sales, proporcionados por esta invención, presentan una pureza del 50 % como mínimo todavía mejor del 70% como mínimo y preferiblemente del 80 % por ejemplo del 90 - 100 %.

15 En otro aspecto, esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende MM 13902 antes descrito o una sal del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En el caso más adecuado, las composiciones de esta invención contienen una sal sódica o potásica de MM 13902, por ejemplo la sal disódica o dipotásica de MM 13902.

25 Estas composiciones pueden encontrarse en una forma adecuada para uso oral, tópico o parenteral. Por ejemplo, pueden utilizarse tabletas, cápsulas, cremas, jarabes, polvos reconstituibles y formas estériles adecuadas para la inyección o infusión. Estas composiciones pueden contener materiales convencionales farmacéuticamente aceptables, como diluyentes, ligantes, colorantes, aromatizantes, preservativos, desintegrantes y similares, de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, de forma conocida por los expertos en la formulación de antibióticos como las penicilinas y las cefalosporinas.

30

1 El MM 13902 o sus sales pueden estar presente en compo-
sición de esta invención como único agente terapéutico o pue-
de estar presente junto con un antibiótico de β -lactama. Los
antibióticos de β -lactama adecuados son los conocidos por
5 ser susceptibles a las β -lactamasas y también por poseer -
cierta resistencia intrínseca a las β -lactamasas. estos anti-
bióticos de β -lactama son la ampicilina, amoxicilina, bencil-
penicilina, fenoximetilpenicilina, propicilina, cefaloridina,
cefoxitina, cefalocitina, cefalexina, carbenicilina, ticarci-
10 lina y los ésteres hidrolizables in vivo de estos compuestos.
tales como los ésteres fenílicos, fenílicos, tolílicos o inda-
nólicos de carbenicilina o ticarcilina o los ésteres acetoxi-
metílicos, pivaloiloimetílicos o ftalidílicos de ampicilina,
amoxicilina, bencilpenicilina, amoxicilina, cefaloridina, ce-
15 faloglicina y similares.

La relación de MM 13902 o de una sal del mismo a anti-
biótico de β -lactama está comprendida normalmente entre 10:1
y 1:10, por ejemplo entre 3:1 y 1:3.

20 La cantidad total de agentes antibacterianos presente
en cualquier dosis unitaria normalmente estará comprendida
entre 50 y 1500 mg y habitualmente entre 100 y 1000 mg.

25 Las composiciones de dosis unitarias preferidas de acuer-
do con esta invención son administradas una o más veces al
día. por ejemplo dos a cuatro veces al día, en el tratamien-
to de las enfermedades del tracto urinario, tracto respira-
torio, tejidos blandos y similares. Así las composiciones
pueden ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades tales
como bronquitis, gonorrea, otitis media, mastitis y similares.

30 En uno de sus aspectos, esta invención proporciona un
procedimiento para la preparación de MM 13902 o una de sus

1 sales, que consiste en separar cromatográficamente una solu-
ción de MM 4550 (complejo) como se describe más adelante,
en fracciones constituidas esencialmente por una solución
de MM 13902 o una sal del mismo y otras fracciones y aislar
5 de la solución el MM 13902 o una sal del mismo.

Por fracciones "constituidas esencialmente por una so-
lución de MM 13902 o una sal del mismo" se entiende que o
bien el único material antibiótico presente en esa solución
es MM 13902 o una sal del mismo o que si hay presente cual-
quier otro material antibiótico, entonces se encuentra en
10 menor proporción que el MM 13902 o que sus sales. Lo adecua-
do es que el MM 13902 o una de sus sales represente el
70 %, todavía mejor el 80 % y preferiblemente el 90 -100 %
del material antibiótico presente en la fracción. Hemos en-
15 contrado que un método aceptable de determinación de que frac-
ciones están constituidas esencialmente por una solución de
MM 13902 o una sal del mismo consiste en estudiar el espec-
tro de absorción ultravioleta de cada muestra. Las fraccio-
nes que presentan un espectro ultravioleta similar al de la
20 Figura 1 normalmente contiene MM 13902 o una sal del mismo,
esencialmente exentos de otros materiales antibióticos tales
como MM 4550 que será descrito más adelante. En general, las
fracciones que presentan un máximo de absorción ultravioleta
25 marcado a unos 305 nm son de la pureza deseada.

Normalmente se utiliza el procedimiento anterior para
el aislamiento del MM 13902 como sal dibásica. Si se requiere
una sal monobásica de MM 13902 o el ácido libre MM 13902 pro-
piamente dicho, pueden ser preparados por acidulación de una
sal dibásica de MM 13902 porque, en general, las sales mono-
30 básicas de MM 13902 y el ácido libre MM 13902 no son suficien

1 temente estables para aislarlos de las mezclas tales como
MM 4550 (complejo) descrito más adelante. Estas sales mono-
básicas y ácidos libres no son fácilmente obtenibles debi-
do a su poca estabilidad.

5 Como ya se ha dicho, creemos que el aislamiento cromatográfico del MM 13902 se efectúa mejor utilizando una sal de MM 13902, como la sal disódica. Las sales de MM 13902 son más solubles en los sistemas disolventes acuosos que en los disolventes altamente lipofílicos y, por consiguiente
10 se prefiere utilizar sistemas disolventes acuosos en las purificaciones cromatográficas empleadas en esta invención. En nuestras manos, las soluciones acuosas de electrolitos reguladas hasta pH aproximadamente neutro han resultado adecuadas para uso en combinación con materiales de soporte polares, tales como resinas básicas cambiadoras de ión. Así,
15 puede utilizarse una solución acuosa de cloruro sódico regulada a pH aproximadamente 7 con un regulador convencional, tal como un regulador de fosfato, en combinación con materiales de soporte que pueden contener grupos amino terciarios o grupos amonio cuaternario. Hemos encontrado que las celulosas básicas cambiadoras de ión y los dextranos reticulados básicos cambiadores de ión constituyen materiales de soporte adecuados y que, en particular, el QAE Sephadex A25 es un
20 material de soporte altamente adecuado, especialmente cuando el sistema disolvente contiene cloruro sódico 0,7M en solución reguladora de fosfato a pH 7 (El "Sephadex" es una marca registrada).

25 Alternativamente, en nuestras manos, han resultado adecuados los sistemas disolventes que comprenden mezclas de
30 agua y disolventes orgánicos miscibles con agua, tal como

1 alcanol inferior, para uso en combinación con materiales
de soporte inertes como gel de sílice o celulosa. Un sistema
disolvente especialmente adecuado para uso con la celulosa es
una mezcla de agua e isopropanol, especialmente una mezcla 7:3
5 de isopropanol y agua.

Sin embargo, el producto del procedimiento anterior
que emplea resinas intercambiadoras de iones frecuentemente
contiene una proporción muy alta de cloruro sódico, de mane-
ra que es beneficioso desalificar las soluciones reunidas.
10 La desalificación puede ser efectuada haciendo descender la
solución por una columna que contiene un material lipofílico
sobre el que es adsorbido el MM 13902 pero que no absorbe al
cloruro sódico. Los materiales adecuados para la columna son
los poliestirenos como Amberlite XAD 4. Alternativamente la
15 filtración gelificada puede emplearse usando agentes de fil-
tración gelificados tales como dextranos reticulados, como
Sephadex G 25 y geles de poliacrilamida como Biogel P2
("Amberlite", "Sephadex" y "Biogel" son marcas registradas).
El antibiótico puede ser eluido de la columna utilizando
20 agua, metanol acuoso o similares.

Cuando las soluciones deseadas se obtienen por el pro-
cedimiento anterior, la sal dibásica de MM 13902 puede ser
obtenida en forma sólida por separación del disolvente en
condiciones suaves. Hemos encontrado que un método acepta-
25 ble de obtención de este material sólido es evaporar bajo pre-
sión reducida y liofilizar las fracciones que contienen MM
13902.

Si se desea, el procedimiento anterior puede ser efec-
30 tuado en dos o más etapas. Por ejemplo, una solución de MM
4550 (complejo) puede ser separada en fracciones que compren-

1 den MM 13902 o una de sus sales, contaminadas con hasta su
propio peso de otros agentes antibacterianos, las fracciones
pueden ser liofilizadas para dar un material que contiene
por ejemplo, alrededor de 50-60 % de MM 13902 o una sal del
5 mismo y este material puede ser después recromatografiado
para dar un material que contiene; por ejemplo, 90-100 % de
MM 13902 o una sal del mismo.

Para los fines de esta memoria, el término "MM 4550 (com-
plejo)" se utiliza para describir el material originalmente
denominado MM 4550 en la patente británica nº 1.363.075. El
10 MM 4550 (complejo) producido por repetición de los ejemplos
de la Patente británica nº 1.363.075 es un material impuro
que contiene en diversas proporciones sales de MM 4550 (como
se describirá más adelante) y sales de MM 13902 y considera-
15 bles cantidades de otros materiales. El MM 4550 (complejo)
no tiene el espectro ultravioleta característico del MM
13902. El I_{50} (descrito más adelante) del MM 4550 (complejo)
producido por repetición de los ejemplos de la patente bri-
tánica número 1.363.075, no es normalmente inferior a 0,0004
20 $\mu\text{g/ml}$. La relación de sales de MM 4550 a sales de MM 13902
presentes en el MM 4550 (complejo) se cree que es muy varia-
ble y creemos que depende de factores tales como la cepa de
organismo utilizada y/o de las técnicas exactas de aislamien-
to empleadas pero se ha encontrado en general que el comple-
25 jo contiene más MM 4550 que MM 13902. La preparación de MM
4550 (complejo) es descrita más adelante en la sección rela-
tiva a "Descripciones".

Para los fines de esta memoria, el término "MM 4550" se
30 utiliza para describir un compuesto prácticamente puro que
es un potente inhibidor de la β -lactamasa y que también posee

1 un cierto grado de actividad antibacteriana. Las propiedades del MM 4550 están descritas más adelante en la sección relativa a "Descripciones".

5 En otro aspecto, esta invención proporciona un procedimiento para la preparación de MM 13902 y sus sales, cuyo procedimiento comprende el cultivo de una cepa de Streptomyces productora de MM 13902 y después la recuperación del MM 13902 o de sus sales del cultivo.

10 Para este procedimiento, hemos encontrado que las cepas productoras de MM 13902 son las cepas de Streptomyces olivaceus y organismos afines, como se describe más adelante.

En el caso más adecuado, el organismo empleado es una cepa de Streptomyces olivaceus tal como ATCC 21379, 21380, 21381, 21382, 31126 o mutantes de los mismos.

15 Un organismo especialmente preferido para uso en este procedimiento es el Streptomyces olivaceus ATCC 31126.

20 En el sentido utilizado aquí, el término "cultivo" significa el crecimiento aerobio deliberado de un organismo, en presencia de fuentes asimilables de carbono, nitrógeno, azufre y sales minerales. Este crecimiento aerobio puede tener lugar en medios nutritivos sólidos o semisólidos o en un medio líquido en el que los nutrientes están disueltos o suspendidos. El cultivo puede tener lugar sobre una superficie aerobia o en un cultivo sumergido. El medio nutritivo puede estar constituido por nutrientes complejos o puede estar químicamente definido. En nuestras manos, hemos encontrado que son especialmente adecuados los medios que contienen nutrientes complejos tales como extractos de levadura, harina de soja y similares. También hemos encontrado que la adición de 25 iones cobalto, innes' sulfato y carbonato cálcico es benefi- 30

1 ciosa.

Hemos encontrado que el cultivo a una temperatura de 28 ± 2°C produce rendimientos aceptables de antibiótico y que un buen momento para cosechar el caldo es 2-3 días después de iniciarse la fermentación.

En el sentido utilizado aquí, el término "mutante" incluye cualquier cepa mutante que surja espontáneamente o a través del efecto de un agente externo, ya sea este agente aplicado deliberadamente o accidentalmente. Los métodos adecuados de producción de cepas mutantes son los señalados por H.I. Adler en Techniques for the Development of Micro-organisms en "Radiation and Radioisotopes for Industrial Micro-organisms", Proceedings of a Symposium, Viena 1973, pág, 241, Agencia Internacional de Energía Atómica, y estos incluyen:

- i. Radiación ionizante (tales como rayos X y γ), luz ultravioleta, luz ultravioleta más un agente fotosensibilizante (como 8-metoxipsoraleno) , ácido nitroso, hidroxilamina, análogos de la base pirimidina (tal como 5-bromouracilo), acridinas, agentes alquilantes (como gas de mostaza, metanosulfonato de etilo), peróxido de hidrógeno, fenoles, formaldehído, calor y
- ii. Técnicas genéticas, tales como recombinación, transformación, transducción, lisogenización, conversión lisogénica y técnicas selectivas para mutantes espontáneos.

Hemos encontrado que el uso de un agente promotor de la mutación puede conducir a la producción de organismos que tienen la habilidad de producir cantidades mayores de los antibióticos deseados. Por ejemplo, la irradiación de cultivos de Streptomyces olivaceus ATCC 21379 seguida de aisla-

1 miento de la cepa resultante que parece producir la zona
más grande de actividad en el ensayo KAG descrito más adelan-
te conduce al aislamiento de Streptomyces olivaceus ATCC
31126, que constituye una cepa preferida para uso en esta
5 invención.

El ATCC 31126 ha sido también depositado en Holanda como
CBS 155.75.

En general, todos los procedimientos de aislamiento y
purificación utilizados para obtener el antibiótico deseado
10 deben tener lugar a temperaturas no elevadas, por ejemplo
por debajo de 20°C y todavía mejor no superiores a 12°C.

Normalmente el producto deseado se obtiene predominate-
mente del filtrado del cultivo de manera que la etapa ini-
cial preferida en el proceso de aislamiento es la separación
15 del material sólido de la fermentación, por ejemplo por fil-
tración.

Puede obtenerse un preparado impuro de MM 13902 o de una
sal del mismo a partir del filtrado del cultivo clarificado
por absorción del MM 13902 o una sal del mismo sobre un mate-
20 rial activo tal como carbón activo o similares y después elu-
ción de la sustancia deseada para separarla del material ac-
tivo, utilizando undisolvente tal como acetona acuosa. Nor-
malmente, este procedimiento se lleva a cabo con una sal dibá-
sica de MM 13902.

25 Alternativamente, puede obtenerse un preparado impuro de
MM 13902 o de una sal del mismo a partir del filtrado del
cultivo, por extracción, utilizando una sal amónica lipofili-
ca y un disolvente no miscible con agua. Frecuentemente esto
es más eficaz que el procedimiento, antes descrito. (El MM ;
30 13902 puede ser obtenido como sal amónica sustituida por eva-

1 poración del disolvente orgánico a presión reducida). Preferiblemente, la solución inicial de la sal amónica sustituida
de MM 13902 es después retro-extraída en una fase acuosa,
5 utilizando una solución de un yoduro de metal alcalino como yoduro sódico. Esta última variante del procedimiento conduce en general a la preparación de una solución acuosa de una sal dibásica impura de MM 13902.

Streptomyces olivaceus y organismos relacionadas tienen las siguientes características principales:

- 10 a) Poseen micelia aérea esporulante bien en las series grises o amarillas.
b) Poseen una morfología esporófito del tipo rectiflexible o espiral.
c) Poseen esporas de superficie lisa.
15 d) No producen melamina.

Las especies que poseen estas características incluyen las relacionadas en las tablas 5 a 9.

Las formas impuras de MM 13902 o sus sales, tal como se han descrito antes, son normalmente sometidas a los procesos cromatográficos más adelante descritos, con objeto de producir un material de pureza aceptable.

Las siguientes Descripciones elucidan la información general útil en el aislamiento de compuestos antibacterianos. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de aspectos de la invención.

DESCRIPCION 1

Determinación del I₅₀

El valor I₅₀ es la cantidad de material requerida para, producir un 50 % de inhibición de la hidrólisis de la ampici-

1 lina por el enzima β -lactamasa del Escherichia coli B11,
un organismo que contiene una β -lactamasa controlada por el
factor R. Esta β -lactamasa se clasifica como enzima del ti-
po IIIa, de acuerdo con la clasificación de Richmond y Sykes
5 [Adv. in Microbiol. Physiol. 9, 31 (1973)] .

La velocidad de hidrólisis de la β -lactamasa de la ampi-
cilina a su ácido peniciloico puede ser seguida por un ensa-
yo yodométrico con almidón, en el que se mide la velocidad
de formación de ácido peniciloico siguiendo la decoloración
10 del complejo almidón-yodo. Este método y la preparación de
la β -lactamasa están descritos en un trabajo de Cole M.,
Elson S., y Fullbrook P.D. (Biochemical Journal 1972, 127,
295-308). Se ha utilizado una ligera modificación del método
anterior que consiste en que la muestra de inhibidor es pre-
15 viamente incubada con un enzima durante 15 minutos a 37°C,
antes de agregarla a la ampicilina de substrato. El procedi-
miento fue el siguiente:

Reactivo

20 Regulador de pH: Regulador de fosfato potásico 0,05M a
pH 7

Solución de almi- Preparada como describe Novick, Biochemi-
don/yodo cal J. (1962) 83, 236

Substrato: 40 μ g/ml de ampicilina en solución regu-
ladora

25 Enzima β -lactamasa: Preparada a partir de E. coli B11, como
describen Cole y colaboradores, Biochem.
J. (1972) 127, 295. La dilución de la
preparación del enzima en regulador es
tal que produce una caída de alrededor
de 0,3 unidades de densidad óptica por
100 segundos en la reacción no inhibida.
Pueden utilizarse otras cepas de E. coli
productoras de β -lactamasa, especialmen-
te las que llevan un factor R, por ejem-
plo R TEM.

30 Condiciones

1 Las reacciones se llevan a cabo en cubetas de 1 cm a
37°C, en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 800. Este instru-
mento puede llevar cuatro cubetas de muestra y sus blancos
correspondientes. La primera cubeta se utiliza para la reac-
5 ción de control y no contiene inhibidor. Las cubetas segunda
tercera y cuarta, se utilizan para diversas diluciones del
inhibidor. Así:

	<u>Reactivos</u>	<u>Cubeta de muestra</u>	<u>Cubeta de blanco</u>
10	Reactivo almidón/yodo	1,0ml	1,0 ml
	β -lactamasa de <u>E. coli</u>	0,1 ml	-
	Regulador	0,3 ml	0,4 ml
	Inhibidor del regulador	0,1 ml	0,1 ml
15	Substrato (añadido despues de incuba- ción de las mezclas anteriores du- rante 15 minutos a 37°C)	1,0 ml	1,0 ml

Las reacciones se siguen registrando las variaciones
de densidad óptica a 590 nm y midiendo la velocidad de la
reacción como variación de la densidad óptica por 100 segun-
dos, durante un intervalo de tiempo de 3-6 minutos. La mues-
tra de inhibidor se diluye hasta que se alcanza una dilución
20 que da un 50 % de la velocidad de reacción observada en el
control sin inhibidor.

DESCRIPCION 2

El ensayo KAG

25 El ensayo KAG es un método para determinar la presencia
de un inhibidor de β -lactamasa en los caldos de fermentación
o durante las fases de aislamiento. Un ágar nutriente fundi-
do a 45°C se siembra con una cepa adecuada de Klebsiella ae-
rogenes productora de β -lactamasa y después se mezcla con
30 una cantidad suficiente de una solución estéril de penicilina

1 G para dar una concentración de $\mu\text{g/ml}$ de penicilina G en el
ágar. Después se vierte el ágar en una placa Petri y, des-
pues de la solidificación, se realizan unos pozos cilíndri-
cos a distancias iguales en la capa de ágar, utilizando un
5 cortador metálico estéril. Las soluciones a ensayar se in-
troducen en los pozos. Después se incuba la placa a una tem-
peratura constante comprendida entre 27° y 37°C . Durante el
periodo de incubación, cualquier inhibidor en la solución de
ensayo se difunde fuera del pozo al ágar y allí inhibe la
10 acción de la β -lactamasa producida por las células de
Klebsiella. La penicilina G es así protegida de la destruc-
ción por la β -lactamasa y está presente a concentración
suficiente para evitar el crecimiento de la Klebsiella. En
las partes del ágar a las que no se ha difundido el inhibi-
dor en concentración suficiente, la penicilina G es destruí-
da por la β -lactamasa, permitiendo el desarrollo de un den-
so crecimiento de la Klebsiella. Así se forman unas zonas
15 circulares transparentes de inhibición del crecimiento de
Klebsiella alrededor de los pozos que contienen el inhibidor
dependiendo el tamaño de cada zona de la concentración del
inhibidor en la solución bajo ensayo. La potencia (unidades
arbitrarias/ml) de las soluciones de ensayo se obtiene por
referencia a una línea patrón de logaritmo de la concentra-
ción del inhibidor contra el diámetro de la zona. Este
20 sistema de ensayo también puede ser utilizado para bioauto-
grafías.

DESCRIPCION 3

Preparación de MM 4550 (complejo) comparable a la descrita en

la patente británica nº 1.363.075

30 Se cultiva el Streptomyces olivaceus ATCC 21379, du-

1 rante 7 días, a 28°C sobre un cultivo inclinado de ágar sólido, en un frasco Roux. El medio de ágar tiene la siguiente composición:

	<u>Constituyente</u>	<u>Cantidad (g/l)</u>
5	Extracto de Levadura	10,0
	Monohidrato de glucosa	10,0
	Agar	15,0
	Agua corriente hasta	1 l

(El "extracto de levadura" es "Yeatex" suministrado por la Bovril Food Ingredients, P.O. Box 18, Wellington Road, Burton-on-Trent, Inglaterra, y el "ágar" fue suministrado por Oxid Limited; Southwark Bridge Road, Londres, S.E. 1., Inglaterra).

15 El medio se ajusta a pH 6,8 antes de la esterilización. Se añaden 50 ml de agua desionizada estéril conteniendo 0,02 % de Tween 80 (marca registrada: El Tween 80 es un monooleato de polioxietilensorbitano) a un cultivo en frasco de Roux y las esporas se suspenden sacudiendo. Esta suspensión de esporas se añade después como inoculum a 75 l de un medio de fase de siembra esterilizado, en un fermentador de acero inoxidable de 100 l. La composición del medio de fase de siembra es la siguiente:

	<u>Constituyente</u>	<u>Cantidad (g/l)</u>
25	Harina de soja	10,0
	Monohidrato de glucosa	20,0
	Agua corriente hasta	1 l

(La "harina de soja" es Arkasoy 50 suministrada por la British Arkady Co. Ltd., Old Trafford, Manchester).

30 Para controlar la formación de espuma, se añaden 50 ml de una solución de Pluronic L81 (marca registrada) al 10 %

1 en volumen/volumen en aceite de soja al medio de fermentación,
antes de la esterilización (El Pluronic L81 es suministrado
por Jacobsen van den Berg U.K. Ltd., 231 The Vale, Londres,
W.3., Inglaterra y es un polímero de bloque de óxido de eti-
5 leno y óxido de propileno).

El medio se esteriliza a vapor en el fermentador du-
rante 20 minutos a 120°C. El cultivo de fase de siembra se
agita a 340 rpm con un agitador de disco de paletas a 8,5"
(21,6 cm) de diámetro y se suministran 150 l/minuto de aire
10 estéril a través de un rociador de extremo abierto. La vasi-
ja de cultivo está provista de tabiques. La temperatura se
controla a 28°C y, después de la incubación bajo estas con-
diciones durante 45 horas, se añaden 7,5 l de este cultivo de
siembra como inoculum a 150 l de un medio de fermentación
15 estéril contenido en un fermentador de acero inoxidable de
300 l. El medio de fermentación tiene la siguiente composi-
ción:

<u>Constituyente</u>	<u>Cantidad (g/l).</u>
Harina de soja (Arkasoy 50)	10,0
Monohidrato de glucosa	20,0
Greda (carbonato cálcico precipitado)	0,2
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,001
Agua corriente hasta	1 l

25 Se añaden 300 ml de Pluronic L81 al 10 % en aceite de
soja para evitar la formación de espuma. La fermentación
se cosecha al cabo de 48 horas y se clarifican por centrifu-
gación. El caldo clarificado de una inhibición del 50 % en
el ensayo con enzima a una dilución de 1 en 100.000. Se agi-
tan 100 l del caldo clarificado con 12 kg de peso húmedo de
30 celulosa cambiadora de ión Whatman DE32 (marca registrada)

1 en forma de acetato (suministrada por H. Reeve Angel and Co.,
14 New Bridge Street, Londres E.C.4, Inglaterra; el material
es una celulosa microcristalina sustituida con grupos dietil-
aminoetilo).

5 Se filtra la suspensión y el MM 4550 (complejo) se
eluye de la celulosa con 12 l de sulfato potásico 0,5M. El
extracto se concentra a 6 l en un evaporador de película as-
cendente bajo vacío y por debajo de 30°C. Gran parte del sul-
fato potásico precipita por adición de 12 l de acetona. Se
10 filtra la solución y se concentra hasta 200 ml por evapora-
ción a vacío por debajo de 30°C. El concentrado se carga en
una columna de 76 mm x 2 m de resina Amberlite XAD-4 (marca
registrada) (fabricada por Rhom and Haas Co., Filadelfia,
Estados Unidos; el material es una resina de poliestireno no
15 iónica), se eluye con agua desionizada y el eluato se reco-
ge en fracciones de 140 ml. Las fracciones activas, detecta-
das por el ensayo KAG, se reúnen (2,2 l) y se concentran
hasta 275 ml por ultrafiltración, utilizando una membrana
de Amicon UM-05 (150 mm de diámetro) (marca registrada) (su-
20 ministrada por Amicon Ltd., 57 Queen's Road, High Wycombe)
bajo una presión de nitrógeno de 60 psi (4,2 kg/cm²). El con-
centrado se liofiliza para dar 2,2 g de un polvo marrón
(I₅₀ 0,004 µg/ml).

25 Se disuelve 1 g del polvo en 1 l de sulfato sódico
0,2M y se mezcla con 1 l de sulfato hidrógeno de tetra-n-bu-
tilamonio al 2 % en peso/volumen (suministrado por AB Astra,
Sodertalje, Suecia) en diclorometano. La fase diclorometáni-
ca se separa por la acción de la gravedad, se enfría a -70°C
se filtra para separar el hielo y se concentra por evapora-
30 ción hasta 20 ml. Al concentrado se añaden 400 ml de éter

1 de petróleo 40-60° y el precipitado se recoge por centrifugación. El precipitado se redissuelve en 10 ml de diclorometano y se extrae con 10 ml de agua conteniendo 80 mg de yoduro bórico y 70 mg de carbonato bórico. Se separan las fa-
5 ses, se filtra la fase acuosa y se ajusta a pH 6,5. La solución se liofiliza para dar un polvo amarillo. El sólido se lava con acetona para disolver el exceso de yoduro bórico y el sólido amarillo pálido se recupera por centrifugación y se seca a vacío. El rendimiento es de 13 mg (I_{50} 0,0004
10 $\mu\text{g/ml}$).

DESCRIPCION 4

Demostración de la absorción en carbón del filtrado de cultivo útil para obtener el material descrito en la patente británica nº 1.361.075 .

15 El filtrado del cultivo obtenido en la Descripción 3 dió un diámetro de zona de 17 mm en el ensayo antibacteriano de difusión de ágar en un pozo en la placa contra Klebsiella aerogenes: un diámetro de zona de 38 mm en el ensayo KAG e I_{50}
20 a una dilución de 1 en 100.000. El filtrado del cultivo clarificado (170 l) a 5°C fué percolado mediante flujo ascendente a través de una columna de 9" (22,5 cm) de diámetro rellena hasta una altura de 16" (40 cm) con carbón activo (Farnell B0, suministrado por Dearborn Chemicals Ltd., Dil-
25 ton, Widnes, Lancs., 60-80 mallas, prelavado con HCl 1N y regulado a pH 6 con fosfato) a un caudal de 800-1000 ml/minuto. Se separó el caldo del carbón por lavado con 10 l de
30 agua desionizada y La columna se eluyó con 20 % de acetona a 20°C. Se concentraron las fracciones activas, que ascendían a 10 l, por evaporación a vacío por debajo de 30°C, hasta 6 l y se liofilizaron para dar 282 g de un preparado

1 crudo de MM 4550 (complejo) dando un I_{50} de 0,05 $\mu\text{g/ml}$. La
recuperación de la actividad inhibitoria del enzima fué del
22 %.

5 Otro carbón activo que da resultados similares es el
carbón granulado Darco (suministrado por Honeywill-Atlas
Ltd. Mill Lane, Carshalton, Surrey, Inglaterra).

DESCRIPCION 5

10 Demostración de la cromatografía en resina cambiadora de
ión del filtrado de cultivo útil en la obtención del mate-
rial descrito en la patente británica nº 1.363.075.

Una columna de 1 cm de diámetro interno se rellena
hasta una altura de 6 cm (volumen del lecho 4,7 ml) con re-
sina cambiadora de ión Dowex 21K (20-50 mallas de las nor-
mas estadounidense, forma de cloruro) (La resina Dowex 21K
15 es suministrada por la B.D.H. Chemical Ltd., Poole, Dorset,
Inglaterra y es una resina de poliestireno-divinilbenceno
que contienen grupos básicos). El lecho de resina se lava
después con aproximadamente 4 x 4,7 ml de metanol acuoso al
5 % seguido de 1 x 4,7 ml de agua destilada. Se obtiene 2
20 litros de filtrado del cultivo esencialmente como se ha des-
crito en la Descripción 3 y aplicado a la columna. Después
la resina se lava con metanol acuoso al 50 % para separar
las impurezas. El MM 4550 (complejo) se eluye de la resina
con NaCl al 5 % en metanol acuoso al 50 %. La Tabla I dada
25 más adelante muestra los resultados obtenidos en forma de
unidades de actividad. El contenido en MM 4550 (complejo)
del filtrado del cultivo es arbitrariamente establecido en
8 unidades/ml. Las fracciones eluidas de la columna se ana-
lizan utilizando un método de difusión antibacteriano frente
30 a Klebsiella aerogenes y las unidades de actividad se calcu-

1 lan por referencia a una línea patrón preparada representan
do el diámetro de la zona frente a unidades/ml para diversas
diluciones del filtrado de cultivo (es decir, el filtrado
del cultivo se utiliza como patrón).

5 Puede observarse que la columna constituye un método
eficaz de concentración del MM 4550 (complejo). Las fraccio-
nes 2 a 5, ambas inclusive, contienen 60 % de la actividad
en un volumen total de 37 ml solamente. El peso seco total
de estas fracciones es alrededor de 210 mg mientras que se
10 han añadido a la columna 35 g de sólidos.

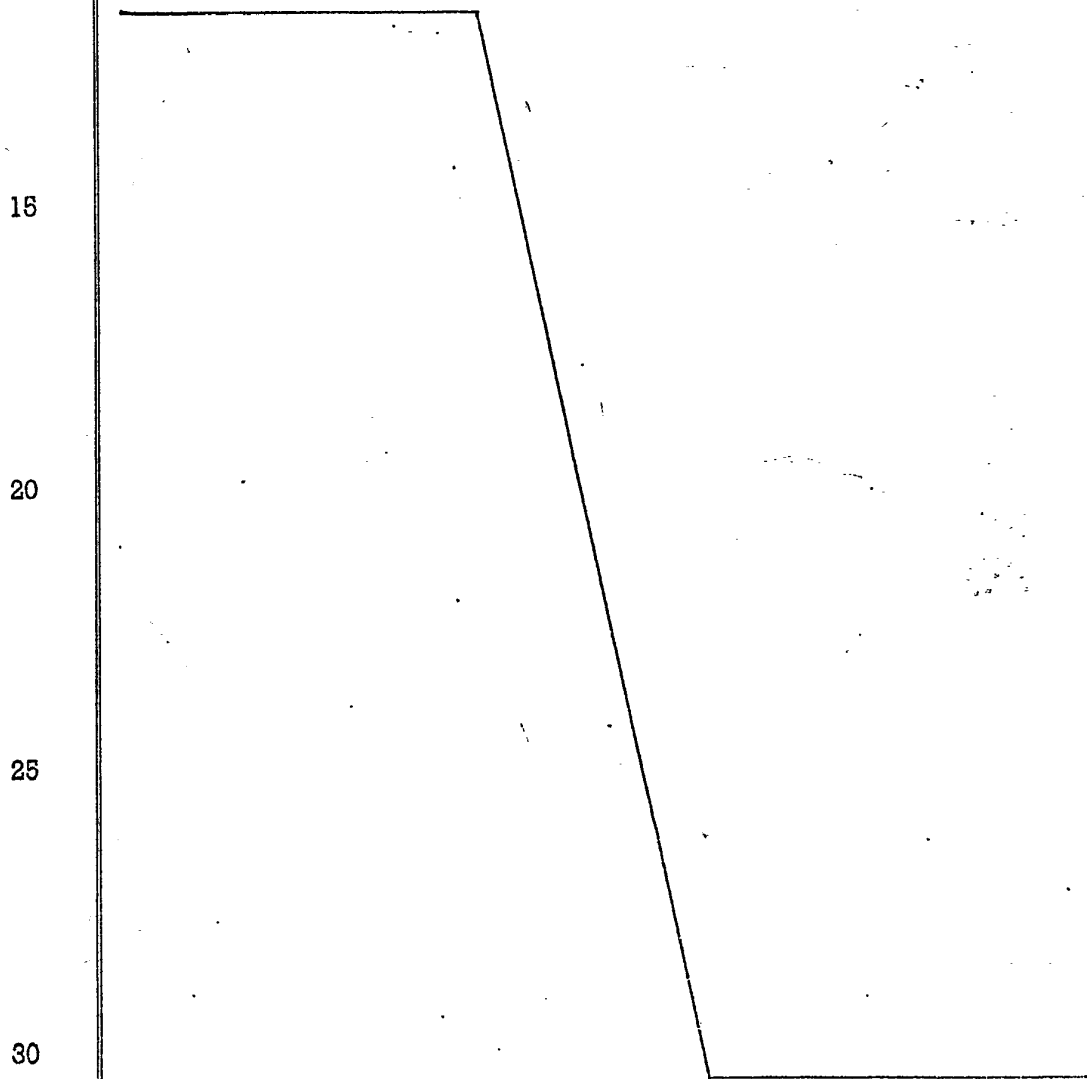


TABLA I

Resultados de la cromatografía sobre Dowex 21K

<u>Muestra</u>	<u>pH</u>	<u>Volumen (ml)</u>	<u>Unidades/ml</u>	<u>Unidades totales</u>
Filtrado del cultivo	6,5	1970	8	15760
Percolado 1	6,9	550	<1	<100
Percolado 2	7,0	525	<1	<100
Percolado 3	7,0	595	<1	<100
Percolado 4	7,0	300	<1	<100
Eluato 1	7,8	7,0	84	588
Eluato 2	7,8	7,0	328	2296
Eluato 3	7,7	8,5	440	3740
Eluato 4	7,7	10,0	320	2200
Eluato 5	7,6	11,5	160	1840
Eluato 6	7,5	11,0	80	880
Eluato 7	7,6	14,2	66	937
Eluato 8	7,6	20,0	33	660
			Total	13141

DESCRIPCION 6

Demstración de la extracción por pareja de iones del filtrado del cultivo útil en la obtención del material descrito en

la patente británica nº 1.363.075

Se añaden 248 g de sulfato sódico a 10 l del filtrado del cultivo clarificado, preparado como se ha descrito en la Descripción 3 y la solución se extrae con 10 l de sulfato hidrógeno de tetra-n-butil-amonio al 2 % en diclorometano, agitando durante 30 minutos. Se separan las fases y la fase de diclorometano se enfría a 2°C. Se separa una pequeña cantidad de agua suspendida por filtración a través de papel Whatman nº 1 PS. La solución en diclorometano se concentra a

1 20 ml por evaporación a vacío por debajo de 30°C. La adición de 400 ml de éter de petróleo (40-60°) precipita una goma que contiene el MM 4550 (complejo).

5 La goma se recoge por centrifugación, se redissuelve en 50 ml de diclorometano y se extrae con 50 ml de agua conteniendo 1 g de yoduro bórico y 1 g de carbonato bórico, sacudiendo durante 2 minutos. El sólido presente se elimina por filtración y se separan las dos fases. La fase acuosa que contiene el MM 4550 (complejo) como sal bórica se ajusta a pH 6,5 y se liofiliza para dar 317 mg de un preparado crudo de MM 4550 (complejo) con un I₅₀ de 0,001 µg/ml.

DESCRIPCION 7

Preparación de un complejo antibiótico parcialmente purificado que contiene MM 4550 y MM 13902, empleando sulfato hidrógeno

15 de tetra-n-butilamonio

Un preparado crudo de MM 4550 (complejo) preparado como en la Descripción 4 se redissuelve en agua (12,5 g en 125 ml) y se extrae con 125 ml de sulfato hidrógeno de tetra-n-butilamonio al 10 % en peso/volumen en diclorometano. Se separan las dos fases y el diclorometano se extrae de nuevo con 100 ml de agua a 2°C, conteniendo 190 mg de yoduro sódico, agitando lentamente y ajustando la fase acuosa a pH 6,4 con NaHCO₃ al 2 %. La solución se liofiliza y el sólido seco se lava con acetona para dar 88 mg de un preparado de sales sódicas mixtas de MM 4550 y MM 13902, con un I₅₀ de 0,0002 µg contra la β-lactamasa del Escherichia coli. La recuperación de antibióticos es del 70 %.

25 La Actividad antibacteriana de mezclas de ampicilina y material preparado como se ha descrito en la Descripción 7 se determinó por el método de dilución seriada en agar nutritivo.

30

1 te. Las concentraciones mínimas de inhibición que se obtuvieron se encuentran en la Tabla II.

TABLA II

Sinergismo entre ampicilina y el material de la descripción

5

2

10

15

20

25

30

Organismo	Ampicilina sola	Ampicilina + MM 4550 (complejo) a		
		0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml
<u>E. coli</u> B11	>500	>500	500	50
<u>E. coli</u> JT417	250	250	250	50
<u>E. coli</u> JT39	>500	>500	500	25 [*]
<u>Shigella sonnei</u> S239	125	125	125	25 [*]
<u>Klebsiella aerogenes</u> A	125	25	5 [*]	<0,1 [*]
<u>Klebsiella aerogenes</u> IP282	50	50	12,5	0,5 [*]
<u>Proteus mirabilis</u> 889	>500	>500	50	0,5
<u>Proteus mirabilis</u> 247	>500	125	5,0	0,5
<u>Proteus morgani</u> F	50	50	25	0,5
<u>Proteus rettgeri</u> R110	250	125	25 [*]	0,25 [*]
<u>Staph. aureus</u> (Russell)	250	125	<0,1	0,25
<u>Staph. aureus</u> (Russell H)	>500	<0,1	<0,1	<0,1

* Inhibición parcial por MM 4550 (complejo) solo a estas concentraciones.

Se observaron unos efectos sinérgicos similares para mezclas de amoxicilina y MM 4550 (complejo).

DESCRIPCION 8

Preparación de complejo antibiótico parcialmente purificado conteniendo MM 4550 y MM 13902, empleando cloruro de cetildimetilbencilamonio

Un producto liofilizado (I₅₀ = 0,02 µg/ml) procedente de una columna de carbono Farnell eluida con acetona/agua como en la Descripción 4, se disuelve en agua destilada a

1 una concentración de 13 mg/ml. La solución se ajusta a pH 6,5.

5 Se extraen 100 ml de la solución con un volumen igual de cloruro de cetildimetilbencilamonio al 0,1 % en diclorometano. Se separan las fases por centrifugación y la fase orgánica se retroextrae con 100 ml de solución de yoduro sódico al 0,05 %. Se separan las fases y el diclorometano que queda en la fase acuosa se separa manteniendo la solución a presión reducida durante 10 minutos.

10 Se liofiliza la solución acuosa y el producto de la liofilización se lava tres veces con 50 ml de acetona cada vez. El producto lavado con acetona se seca en un desecador de vacío para dar un polvo castaño pálido (4,3 mg; $I_{50} = 0,002 \mu\text{g/ml}$).

15 DESCRIPCION 9

Preparación de complejo antibiótico parcialmente purificado, conteniendo MM 4550 y MM 13902, utilizando filtración de gel.

20 Se cromatografía 1 g de MM 4550 (complejo) crudo, I_{50} 0,2 $\mu\text{g/ml}$, preparado por el método de la Descripción 4, sobre Sephadex G25 (calidad fina), utilizando acetona/agua 4:6 en volumen/volumen como eluyente. Las dimensiones de la columna son 2,5 x 32 cm y la elución se realiza a 1,5 ml/minuto. Se combinan las fracciones activas, se concentran a vacío por debajo de 30°C y se liofilizan para dar 22 mg de un sólido amorfo de color ante con un I_{50} de 0,005 $\mu\text{g/ml}$. La recuperación es del 88 % y se obtiene una purificación de 40 veces.

25 DESCRIPCION 10

Preparación de complejo antibiótico purificado conteniendo

30 MM 4550 y MM 13902, empleando cromatografía en celulosa

Se cromatografían 610 mg de MM 4550 (complejo), pre-

1 parado como en la Descripción 7, sobre una columna de celulo-
sa (Whatman CC 31) de 2,5 x 32 cm y se eluye con una mezcla
de isopropanol/agua 7:3 en volumen/volumen, a 1,5 ml/minuto.
5 Se combinan las fracciones antibacterialmente activas, se con-
centran a vacío por debajo de 30°C y se liofilizan para dar
40 mg de un preparado sólido amorfo de color castaño de com-
plejo antibiotico, I₅₀ 0,00007 µg/ml. El pequeñísimo valor
de I₅₀ indica que el material activo es de mayor pureza.

10 En una ocasión diferente, el procedimiento anterior
dió un material con un I₅₀ de 0,001 µg/ml. Este material
tiene la actividad antibacteriana indicada en la Tabla III
cuando se determina por un método de microvaloración normali-
zado en un caldo de sensibilidad Oxoid, utilizando inoculums
ligeros (1 % de caldo de una noche).

15

TABLA III

Actividad antibacteriana de la mezcla de MM 4550 y MM 13902
con un I₅₀ de 0,001 µg/ml

<u>Organismo</u>	<u>CMI en µg/ml</u>
20 <u>Staphylococcus aureus</u> (Oxford)	7,5
<u>Staphylococcus aureus</u> (Russell)	7,5
<u>Streptococcus faecalis</u>	125
<u>Bacillus subtilis</u>	0,9
<u>Escherichia coli</u> (10418)	13,7
<u>Escherichia coli</u> (B11)	15
<u>Klebsiella aerogenes</u>	1,8
25 <u>Enterobacter cloacae</u>	62
<u>Proteus mirabilis</u>	7,5
<u>Providentia stuartii</u>	7,5
<u>Acinetobacter anitratus</u>	0,9
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	250
<u>Serratia marcescens</u>	7,5
<u>Salmonella typhimurium</u>	15
30 <u>Shigella sonnei</u>	7,5

DESCRIPCION 11

MM 4550

El MM 4550 puede ser reconocido por sus propiedades, que son las siguientes:

MM 4550 es un sólido ácido que en forma de sal sódica tiene las siguientes características:

- i. Es muy soluble en agua, soluble en metanol y prácticamente insoluble en cloroformo, éter dietílico e hidrocarburos.
- ii. En solución acuosa, presenta un espectro ultravioleta característico con máximos de absorción a unos 238 nm y unos 287 nm.
- iii. Cuando está presente a una concentración de 0,4 % en peso/peso en un disco de KBr recién preparado, presenta un espectro infrarrojo característico con máximos de absorción, entre otros, aproximadamente a 3450, 2950, 1765, 1695, 1510, 1390 y 1260 cm^{-1} . Si se toma otro espectro aproximadamente una semana después de la preparación del disco de KBr, el espectro presenta considerables variaciones, por ejemplo, el gran pico que se encontraba anteriormente alrededor de 1765 cm^{-1} se ha reducido considerablemente de tamaño o está ausente.
- iv. Tiene un espectro RMN característico cuando se toma en D_2O , cuyo espectro presenta, entre otros: (a) una pareja de dobletes de campo bajo centrados aproximadamente a 2,45 τ 3,65 τ con constantes de copulación de 15 Hz aproximadamente; (b) un doblete centrado a 8,55 τ aproximadamente y (c) un singlete marcado a 7,95 τ aproximadamente.
- v. Cuando se pasa sobre celulosa en un sistema de cromato-

1

grafía en capa fina, presenta los siguientes valores

R_f muy aproximados:

(a) butanol/isopropanol/agua - 7:7:6 en volumen/volumen;

$$R_f = 0,76$$

5

(b) isopropanol/agua - 7:3 en volumen/volumen; $R_f = 0,67$

(c) n-butanol/etanol/agua - 7:7:6 en volumen/volumen;

$$R_f = 0,7$$

(d) n-propanol/agua - 4:1 en volumen/volumen; $R_f = 0,6$

10

vi. Posee actividad antibacteriana contra diversas especies entre las que se encuentran cepas de Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Klebsiella aerogenes, Proteus mirabilis, Acinetobacter anitratus, Serratia marcescens y Shigella sonnei.

15

vii. Posee actividad inhibitoria enzimática contra las β -lactamasas producidas por varias especies, entre otras Escherichia coli, Klebsiella aerogenes y Staphylococcus aureus. Tiene un I_{50} (definido como anteriormente) inferior a 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ contra la β -lactamasa de Escherichia coli B11.

20

viii. Cuando se mezcla con ampicilina, sinergiza su actividad contra organismos tales como cepas de Escherichia coli, Klebsiella aerogenes, Proteus mirabilis, Proteus morgani y Staphylococcus aureus Russell.

25

ix. El análisis de aminoácidos indica que el material no es un polipéptido ni una proteína. No se encuentra ningún ácido α -aminoadípico después de la hidrólisis ácida.

30

x. Reacciona con el reactivo de Ehrlich (300 mg de 4-metilaminobenzaldehído disuelto en una mezcla de 54 ml de n-butanol, 9 ml de etanol y 9 ml de ácido clorhídrico concentrado) para producir un color azul sobre los cromato-

1 gramas de papel y las láminas de cromatografía en capa fina.

xi. No es un veneno enzimático general y no inhibe a los siguientes enzimas a concentraciones superiores a las requeridas para inhibir a la β -lactamasa del Escherichia coli: monoamina-oxidasa, anhidrasa carbónica, dopa-des-carboxilasa, tripsina, quimotripsina o ureasa.

EJEMPLO 1

Preparación de MM 4550 (complejo) y separación en MM 4550 y

10 MM 13902

Los procedimientos de aislamiento detallados en la sección de descripciones pueden ser utilizados en diversas secuencias. Una secuencia especialmente adecuada es la adsorción en carbón, extracción con un par iónico y cromatografía sobre celulosa, como se describe a continuación:

15 340 litros del filtrado de cultivo (obtenido como en la Descripción 3) son percolados mediante flujo ascendente a 800-1200 ml/minuto a través de una columna (9" (22,5 cm) de diámetro x 21" (53 cm) de altura), rellena con carbón Farnell
20 BO. El carbón ha sido utilizado antes para la adsorción de MM 4550 (complejo) y es regenerado lavando con los siguientes reactivos:

NaOH 0,5N; NaOH 0,2N/acetona (3:2); agua; HCl 1N; agua; regulador de fosfato a pH 6; agua.

25 La columna se lava con 20 l. de agua para desplazar al filtrado del cultivo y se eluye mediante flujo descendente con acetona/agua 2:8 en volumen/volumen, a 200-250 ml/minuto. Se recogen fracciones de 1 litro. Las fracciones que contienen
30 el MM 4550 (complejo), determinado por un ensayo de difusión antibacteriana utilizando Klebsiella aerogenes, se combinan

1 (11 l) y se concentran por evaporación a vacío por debajo de 30°C hasta 5,5 l. La recuperación de MM 4550 (complejo) en esta fases es del 20 %.

5 El concentrado se enfría a 2°C, se añaden 5,5 l de sulfato hidrógeno de tetra-n-butilamonio al 2 % en peso/volumen en diclorometano a -5°C y se mezclan las dos fases entre sí durante 2 minutos. Se separa la fase diclorometánica y se agrega a 1 l de una solución de yoduro sódico (0,6 %) a 0°C. Las dos fases se agitan suavemente y la fase acuosa se ajusta gradualmente a pH comprendido entre 6,5 y 7,0 con solución acuosa al 2 % de NaHCO₃. Se separa la fase acuosa y se liofiliza. El sólido seco se extrae con acetona seca para disolver el exceso de yoduro sódico y la acetona se separa del residuo insoluble a vacío para dar 1,1 g de un polvo de color ante. La recuperación global de MM 4550 (complejo) en esta fase es del 10 %. La purificación calculada sobre el total de sólidos disueltos en el filtrado del cultivo es de 125 veces.

20 Una columna de 2,5 cm de diámetro se rellena con celulosa en polvo (Whatman CC 31) en isopropanol/agua 7:3 en volumen/volumen, hasta una altura de 32 cm. Se disuelven 500 mg del polvo de color ante en 2 ml de isopropanol/agua 7:3 en volumen/volumen y se cromatografía utilizando el mismo disolvente, a un caudal de 1,5 ml/minuto. Se recogen fracciones de 3 ml de la columna y las que presentan máximos de absorción ultravioleta a unos 285 nm se combinan, se concentran y se liofilizan para dar MM 4550 (complejo). Los experimentos previos han establecido que las fracciones que absorben alrededor de 285 nm contienen un material antibacterialmente activo, inhibidor de los enzimas.

25

30

1 El rendimiento de MM 4550 (complejo) liofilizado es de 35 mg. Tiene un aspecto amorfo castaño y un I_{50} de 0,0001 $\mu\text{g/ml}$. La recuperación de material activo en esta fase es del 3 % en total y la purificación es de 600 veces en total.

5 La actividad antibacteriana de este preparado es determinada por el método del microtítulo normalizado en caldo del ensayo de sensibilidad Oxoid, utilizando inoculums ligeros. Las concentraciones mínimas de inhibición resultantes son similares a las mostradas en la Tabla III.

10 El análisis del preparado por cromatografía en capa fina sobre celulosa (láminas de Eastman Kodak "Chromagram") desarrollado con n-butanol/isopropanol/agua (7:7:6) separa dos sustancias activas, una con un R_f aproximado de 0,58 que es denominado MM 4550 y otra con un R_f aproximado de 0,72 que es denominada MM 13902. Estos dos materiales pueden ser detectados por bioautografía sobre una variedad de organismos como B. subtilis, Staphylococcus aureus (Oxford), Staphylococcus aureus (resistente a la penicilina) Escherichia coli (sensible y resistente a la penicilina), Salmonella typhimurium, Proteus mirabilis, Proteus morganii y Klebsiella aerogenes. Algunos de los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla IV.

25 En otro experimento, las dos sustancias se separan sobre una capa fina de celulosa desarrollada con isopropanol/agua (8:2) y extraída de la celulosa con regulador de fosfato. En cada ensayo se determina la inhibición de la β -lactamasa y se demuestra que ambas sustancias son inhibidores de la β -lactamasa de Escherichia coli. También se demuestra que ambas sustancias son sinérgicas con la bencilpenicilina contra la Klebsiella aerogenes.

30

TABLA IV

Actividad antibacteriana de MM 4550 y MM 13902 determinada por bioautografía (cromatografía en capa fina con celulosa y butanol/alcohol isopropílico/agua 7:7:6 en vol./vol.)

Organismo	Diámetro de la zona por bioautografía	
	Zona de MM 4550 en mm a R_f 0,58	Zona de MM 13902 en mm a R_f 0,70.
<u>Klebsiella aerogenes</u>	20,0	20,0
<u>Proteus mirabilis</u>	17,5	13,5
<u>Proteus morganii</u>	16,0	9,5
<u>Salmonella typhi</u>	19,5	21,0
<u>Escherichia coli</u> 10418	20,0	13,5
<u>Escherichia coli</u> B11	17,5	10,5
<u>Enterobacter aerogenes</u>	6,5	ninguna zona
<u>Staphylococcus aureus</u> (Oxford)	13,0	4,0
<u>Staphylococcus aureus</u> (Russell)	12,0	4,0
<u>Bacillus subtilis</u>	24,0	15,0

EJEMPLO 2

Preparación de MM 4550 (complejo) y separación en MM 4550 y MM 13902

Mil cien litros de filtrado de cultivo procedente de la fermentación de Streptomyces olivacea ATCC 31126 a pH 6,5 y 5°C son percolados a 3,2 l/minuto a través de una columna (0,3 m x 1 m) rellena con carbón granulado Darco. (El carbón ya ha sido utilizado para la adsorción de MM 4550 (complejo) y se regenera antes de su uso lavándolo con los siguientes reactivos:

NaOH 0,5N; NaOH 0,2N/acetona (3:2); agua; HCl N; agua; regulador de fosfato, pH 6; agua).

Esta columna se lava con 60 l de agua para desplazar

1 el filtrado del cultivo y se eluye con acetona/agua (2:8 en
volumen/volumen) a 30°C a razón de 1,1 l/minuto. Se recogen
60 l seguido de cinco fracciones de 10 l. Se reúnen las frac-
ciones que contienen el MM 4550 (complejo) (40 l), determina-
5 do por el ensayo de difusión antibacteriana empleando
Klebsiella aerogenes y se concentra a vacío por debajo de
30°C hasta 32 l. La recuperación de MM 4550 (complejo) en es-
ta fase es del 15 %.

10 El concentrado se enfría a 5°C, se añaden 16 l de clo-
ruro de cetildimetilbencilamonio al 0,2 % en diclorometano a
5°C y se mezclan las dos fases durante 5 minutos. Se separa la
fase de diclorometano y se agrega a 3,75 l de una solución de
yoduro sódico al 0,4 % a 5°C. Se mezclan las dos fases duran-
te 5 minutos y la fase acuosa se separa y liofiliza. El sólido
15 seco se extrae con acetona seca para disolver el exceso de
yoduro sódico y el sólido residual se seca a vacío para dar
2,87 g de un polvo de color ante. La recuperación global de
MM 4550 (complejo) en esta fase es del 6 %. La purificación
calculada sobre los sólidos disueltos totales en el filtrado
20 del cultivo es de 160 veces.

Una columna de 63 mm de diámetro se rellena con celu-
losa en polvo (Whatman CC 31) en isopropanol/agua (7:3 en vo-
lumen/volumen) hasta una altura de 300 mm. Se disuelven 2,0 g
del polvo de color ante en 5 ml de isopropanol/agua (7:3 en
25 volumen/volumen) y se cromatografía en el mismo disolvente a
3 ml/minuto. Se reúnen las fracciones que contienen MM 4550
(complejo), determinado por el ensayo frente a Klebsiella
aerogenes, se concentran por evaporación a vacío por debajo
de 30°C y se liofilizan para dar 207 mg de un sólido pardo. La
30 recuperación de MM 4550 (complejo) para esta fase es del 51 %

1 y la purificación es de 5 veces.

Una columna de 16 mm de diámetro se rellena con celulosa en polvo (Whatman CC 31) en n-propanol/agua (4:1 en volumen/volumen) hasta una altura de 300 mm. Se disuelven
5 198 mg del sólido pardo en agua/n-propanol (1:1) y se cromatografía en n-propanol/agua (4:1 en volumen/volumen) a un caudal de 0,5 ml/minuto. Se recogen las fracciones (6 ml), se bioensayan frente a Klebsiella aerogenes y se mide el espectro ultravioleta de cada fracción. Las fracciones 23-28,
10 con un máximo ultravioleta a 305 nm aproximadamente, contienen la sal disódica de MM13902. Estas fracciones se reúnen, se concentran a vacío y se liofilizan para dar 30 mg de sólido. Esta preparación presenta solamente una zona de actividad antibiótica R_f 0,77 por cromatografía en capa fina, utilizando placas de celulosa Eastman Kodak con n-propanol/agua
15 (4:1 en volumen/volumen). La zona se detecta por bioautografía sobre Bacillus subtilis. (Las fracciones 29-40, con un máximo de absorción ultravioleta a 285 nm aproximadamente, contienen MM 4550. Se combinan, se concentran a vacío y se liofilizan para dar 53 mg de un sólido que contiene una sal de MM 4550 contaminada con una pequeña cantidad de una sal de MM 13902).

DESCRIPCION 12

Organismo

25 La propiedad de producir MM 4550 (complejo) fué descubierta por primera vez en los cultivos ATCC 21379, ATCC 21380, ATCC 21381 y ATCC 21382 que han sido aislados de muestras de terreno obtenidas en España, Nueva Zelanda, Africa del Sur e Israel, respectivamente. En el laboratorio, estos
30 cultivos parecen idénticos y todos fueron identificados como

1 Streptomyces olivaceus por el Dr. Bousfield, el experto en
actinomicetes de la National Collection of Industrial Bacteria
(NCIB), Torry Research Station, Aberdeen, Escocia, utilizando
la clasificación de 1967 ampliamente aceptada de Hütter (Sys-
5 tematic der Streptomyceten, S. Karger, Basilea, 382 páginas).
Desde entonces se ha encontrado la producción de MM 4550 en
otras especies de streptomyces como puede observarse en la
Tabla IV.

10 El S. olivaceus fué descrito por primera vez por
Waksman en 1919 (Cultural Studies of Species of Actinomyces,
Soil. Sci., 8, 71-215). Posteriormente, en 1960, un grupo de
investigadores rusos describió una especie con característi-
cas muy similares pero que denominaron Actinomyces (Strepto-
myces) fulvoviridis (Kuchaeva y colaboradores, Trud.Inst.
15 Mikrobiol., Akad Nauk. SSSR, 8, 226-253 (1960)).

Los microorganismos del género Streptomyces son ex-
traordinariamente variables en sus características morfológi-
cas y fisiológicas, que dependen de las condiciones bajo las
que son cultivados. Se han publicado descripciones de muchas
20 especies antes de haberse reconocido la existencia de esta
extraordinaria variabilidad, con la consiguiente duplicación
y sinonimia. Hütter (1967) cita 25 especies como sinónimas
del S. olivaceus, incluido el S. fulvoviridis. Para resolver
la confusión en nomenclatura y clasificación, se inició en
25 1962 el International Streptomyces Project, Shirling y cola-
boradores, Int.J.Syst.Bacteriol, 18, 69-189 (1968). Los cola-
boradores de este proyecto han realizado una serie de estu-
dios dirigidos a producir descripciones precisas de las espe-
cies de Streptomyces bajo condiciones normalizadas. En este
30 esquema, se han producido descripciones normalizadas de tipos

1 de cepas de unas 400 especies citadas incluidos el Streptomyces olivaceus y el Streptomyces fulvoviridis.

5 La descripción I.S.P. de S. olivaceus y S. fulvoviridis difiere solamente en dos caracteres: (i) la forma del esporoforo y (ii) la capacidad para utilizar el inositol como única fuente de carbono.

El S. olivaceus es descrito como sigue:

10 Morfología de la cadena de esporas: Sección Spirales con espirales abiertas que se intergradan a través de cadenas de esporas onduladas que sugieren la Sección Rectiflexibiles. Cadenas de esporas maduras generalmente largas, con frecuencia con más de 50 esporas por cadena.

15 Utilización de carbono: se utilizan para el crecimiento la D-glucosa, L-arabinosa, D-xilosa, i-inositol, D-manitol, D-fructosa y ramnosa. Sin crecimiento o solamente trazas de crecimiento sobre sacarosa y rafinosa.

El S. fulvoviridis es descrito como sigue:

20 Morfología de la cadena de esporas: Sección Rectiflexibiles. Cadenas de esporas maduras moderadamente cortas con 10-50 esporas por cadena. Utilización de carbono: se utilizan para el crecimiento la D-glucosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-manitol, D-fructosa y ramnosa; la utilización de sacarosa es dudosa. Crecimiento nulo o solamente trazas de crecimiento sobre i-inositol o rafinosa.

25 La caracterización de un número de cultivos denominados o como sinónimos de S. olivaceus o S. fulvoviridis y otras especies afines ha sido determinada utilizando los métodos y medios normalizados (Shirling y colaboradores, Int. J. Syst. Bacteriol, 16, 313-340 (1966)), recomendados en el International
30 Streptomyces Project (ISP).

1 Los cultivos derivan de diferentes fuentes. Los
ATCC 21379, 21380, 21381 y 21382 fueron aislados del suelo
sobre la base de producir MM 4550 (complejo). Las otras ce-
5 pas fueron obtenidas de diversas colecciones de cultivos con
fines comparativos.

 Los resultados de los ensayos para la producción de
MM 4550 (complejo), color del micelio aéreo soluble, forma
del esporoforo, color del micelio substrato, producción de
pigmenta soluble, producción de melanina y utilización de
10 fuentes de carbono se encuentran en las Tablas IV-VIII. Para
todas las cepas, la superficie de las esporas, observada por
microscopía electrónica, es lisa.

 De la descripción ISP resulta evidente que el cre-
cimiento espiral del esporoforo en el S. olivaceus es un ca-
15 rácter variable. Se observan verdaderas espirales con una fre-
cuencia variable en la especie tipo de S. olivaceus, es decir
ATCC 3335. La mayoría de los esporoforos son largos. No se
observa ninguna espiral verdadera en los cultivos ATCC 21379,
21380, 21381 o 21382, aunque los esporoforos son largos y pre-
20 sentan una tendencia a la espiral entre un fondo de tipos
Rectiflexibles. Sin embargo, en dos cepas de S. olivaceus,
NCIB 8238 y NCIB 8509, la mayoría de los esporoforos son del
tipo Rectiflexibles. En el NCIB 8238 son de longitud media
mientras que las del NCIB 8509 son largas.

25 Los esporoforos observados a partir de ATCC 15863, la
especie tipo de S. fulvoviridis, son más cortos que los ob-
servados en los aislados ATCC 21379, 21380, 21381, 21382 y
31126 y solamente son de los tipos Rectiflexibles. Conres-
pecto a este carácter, por lo tanto, los aislados ATCC 21379
30 21380, 21381, 21382 y 31126 corresponden bastante bien pero

1 no exactamente a la descripción del S. olivaceus.

Los aislados ATCC 21379, 21380, 21381, 21382 y 31126
5 presentan cierta variabilidad con respecto a la utilización
del inositol que es el otro carácter diferenciante de acuerdo
con las descripciones de las especies tipo I.S.P. entre
las especies S. olivaceus y S. fulvoviridis (Tabla VIII).

El ATCC 31126 y el ATCC 21380 utilizan inositol, que es ca-
racterístico del S. olivaceus, mientras que las otras cepas
10 presentan una utilización dudosa o negativa. Sin embargo, en
general no se considera satisfactorio separar una especie
sobre la base de su capacidad para utilizar un solo hidrato
de carbono. Esta diferencia puede ser el resultado de una
simple mutación de genes y con frecuencia se considera de
significación de cepas solamente. La diferencia en utiliza-
15 ción de azúcares por las cepas de S. olivaceus NCIB 8138,
NCIB 8509, ATCC 21549, ATCC 12019 y ATCC 3335 sugiere que
muchas autoridades no los consideran de significado sobre la
especie. Por lo tanto, el ATCC 21379, 21380, 21381, 21382 y
31126 son apropiadamente denominados S. olivaceus.

20 Hasta que nuevos estudios descubran diferencias más
importantes entre los cultivos actualmente llamados S. oliva-
ceus y S. fulvoviridis, es posible que finalmente sean reco-
nocidos internacionalmente como especies únicas. En este ca-
so, el nombre correcto por orden de prioridad será S. oli-
25 vaceus y éste incluirá también los cultivos citados por
Hütter como sinónimo del S. olivaceus.

El examen de los filtrados de cultivos de las cepas
de S. olivaceus y especies afines para la producción de
MM 4550 (complejo) puede llevarse a cabo como sigue:

30 Se depositan unas manchas de filtrados de cultivos

1 de las cepas citadas sobre tiras de papel Whatman nº 1 a
20 µl por origen y se cromatografían en n-butanol/isopropo-
nol/agua (7:7:6) durante la noche, en frío. Otra serie de ti-
ras se pasan por n-butanol/ácido acético glacial/agua (12:3:5)
5 también en frío, durante la noche. También se hace pasar una
muestra parcialmente purificada de MM 4550 (complejo) en los
dos sistemas al mismo tiempo, como control.

Alternativamente, es posible extraer 25 ml de caldo
clarificado con 12,5 ml de cloruro de cetilbencilamonio al
10 0,2 % en diclorometano, separar las fases, retener la fase
orgánica, añadir 2,5 ml de solución de yoduro sódico (0,5 %),
sacudir, separar las fases, retener la fase acuosa y utilizar
ésta cromatográficamente, por ejemplo depositando 5 µ sobre
15 tiras de cromatografía en capa fina y haciendo pasar n-buta-
nol/isopropanol/agua 7:7:6.

TABLA V

Capacidad de los cultivos de Streptomyces olivaceus, Strepto-
myces fulvoviridis y especies afines para producir MM 4550

(complejo)

	Cultivo	Producción de MM 4550 (complejo)
20	Streptomyces olivaceus ATCC 21379	+
	" " ATCC 31126	+
	" " ATCC 21380	+
	" " ATCC 21381	+
	" " ATCC 21382	+
25	" " NCIB 8238	+
	" " NCIB 8509	+
	Streptomyces flavovirens ATCC 3320	+
	Streptomyces flavus ATCC 3369	+
	Streptomyces fulvoviridis ATCC 15863	+
	Streptomyces argenteolus ATCC 11009	+
30	Streptomyces sioyaensis ATCC 13989	+

TABLA VI

Streptomyces olivaceus, *Streptomyces fulvoviridis* y especies afines - color y morfología del micelio aéreo esporulante maduro sobre medios I.S.P. después de 14 días de crecimiento

	Cultivo	SS	YM	GA	OM	Morfología de las esporoforas, tamaño medio
	ATCC 21379	gris	gris	gris/blanco	gris	RF largo
	ATCC 31126	gris/marrón	gris/marrón	gris	gris	RF largo
	ATCC 21380	gris	gris	gris	gris	RF largo
10	ATCC 21381	gris	gris	gris pálido	gris/blanco	RF largo
	ATCC 21382	gris/blanco	gris	gris	gris	RF largo
	NCIB 8238	gris/blanco	gris	gris	gris	RF medio
	NCIB 8509	gris	gris	gris	gris	RF largo
	ATCC 21549	gris	gris	gris	gris	S largo
15	ATCC 12019	gris	gris	gris	gris	RF largo/S
	ATCC 3335	gris	gris	gris	gris	RF largo/S
	ATCC 15863	gris/blanco	gris	gris/blanco	gris	RF medio
	ATCC 3320	gris/azul	gris	gris/verde	gris	RF largo
	ATCC 3369	gris	gris	gris	gris pálido/marrón	RF medio/RA
20	ATCC 11009	gris pálido	gris/marrón	gris/blanco	gris/verde	RF medio/RA
	ATCC 13898	blanco/gris	blanco	blanco/amarillo	gris/blanco	S corto

SS = ágar de sales inorgánicas - almidón (Medio ISP 4)

YM = ágar extracto de levadura - extracto de malta (Medio ISP 2)

GA = ágar glicerol-asparagina (Medio ISP 5)

OM = ágar de avena (Medio ISP 3)

RF = rectiflexibles

RA = retinaculiaperti

S = espirales

TABLA VI

Streptomyces olivaceus, Streptomyces fulvoviridis y especies afines - col
lanté maduro sobre medios I.S.P. después de 14 días de crecimiento

1
5
10
15
20
25
30

Cultivo	SS	YM	GA
ATCC 21379	gris	gris	gris/blanco
ATCC 31126	gris/marrón	gris/marrón	gris
ATCC 21380	gris	gris	gris
ATCC 21381	gris	gris	gris pálido
ATCC 21382	gris/blanco	gris	gris
NCIB 8238	gris/blanco	gris	gris
NCIB 8509	gris	gris	gris
ATCC 21549	gris	gris	gris
ATCC 12019	gris	gris	gris
ATCC 3335	gris	gris	gris
ATCC 15863	gris/blanco	gris	gris/blanco
ATCC 3320	gris/azul	gris	gris/verde
ATCC 3369	gris	gris	gris
ATCC 11009	gris pálido	gris/marrón	gris/blanco
ATCC 13898	blanco/gris	blanco	blanco/amarillo

SS = ágar de sales inorgánicas - almidón (Medio ISP 4)

YM = ágar extracto de levadura - extracto de malta (Medio ISP 2)

GA = ágar glicerol-asparagina (Medio ISP 5)

OM = ágar de avena (Medio ISP 3)

RF = rectiflexibles

RA = retinaculiaperti

S = espirales

TABLA VI

omyces fulvoviridis y especies afines - color y morfología del micelio aéreo esporu-
s I.S.P. después de 14 días de crecimiento

S	YM	GA	OM	Morfología de las es- poroforas, tamaño medio
	gris	gris/blanco	gris	RF largo
ón	gris/marrón	gris	gris	RF largo
	gris	gris	gris	RF largo
	gris	gris pálido	gris/blanco	RF largo
co	gris	gris	gris	RF largo
co	gris	gris	gris	RF medio
	gris	gris	gris	RF largo
	gris	gris	gris	S largo
	gris	gris	gris	RF largo/S
	gris	gris	gris	RF largo/S
co	gris	gris/blanco	gris	RF medio
	gris	gris/verde	gris	RF largo
	gris	gris	gris pálido/ marrón	RF medio/RA
do	gris/marrón	gris/blanco	gris/verde	RF medio/RA
is	blanco	blanco/amarillo	gris/blanco	S corto

3) - almidón (Medio ISP 4)

4) - extracto de malta (Medio ISP 2)

(Medio ISP 5)

3)

1 (Los Streptomyces olivaceus ATCC 21549, ATCC 12019 y ATCC 3335 no producen MM 4550 (complejo). El ATCC 15863 también ha sido depositado como RIA 660). (Streptomyces Lipmanii NRRL. 3584 X + X).

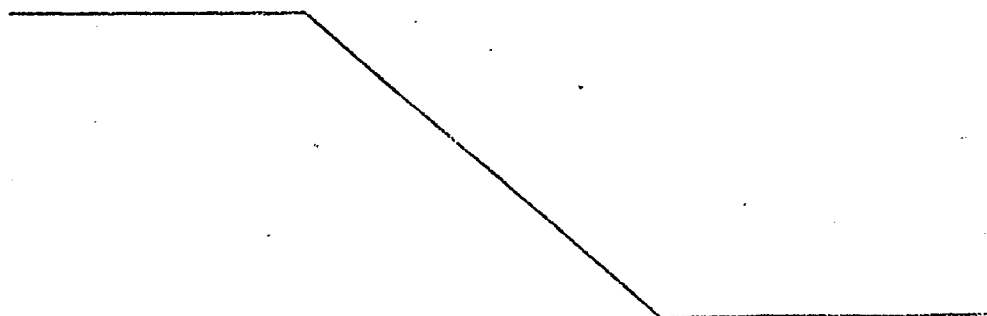
TABLA VII

5 Streptomyces olivaceus, Streptomyces fulvoviridis y especies afines - color del micelio de substrato observado desde el

	Cultivo	<u>reverso</u>			
		SS	YM	GA	CM
	ATCC 21379	oliva	pardo oliva	gris/marrón	verde oliva
10	ATCC 31126	pardo oliva	pardo oliva	marrón	pardo oliva
	ATCC 21380	oliva	verde oliva	pardo oliva	amarillo oliva
	ATCC 21381	marrón oscuro	marrón oscuro	verde oliva	verde oliva
	ATCC 21382	oliva	oliva	marrón	verde oliva
	NCIB 8238	marrón	oliva/marrón	marrón	amarillo oliva
15	NCIB 8509	marrón	oliva	pardo oliva	amarillo oliva
	ATCC 21549	ante/negro	marrón/negro	marrón/negro	ante/gris
	ATCC 12019	ante	ante	ante	ante
	ATCC 3335	marrón	marrón	marrón	gris
	ATCC 15863	marrón/gris	marrón oscuro	pardo oliva	amarillo oliva
20	ATCC 3320	amarillo/marrón	oliva/marrón	oliva/marrón	naranja/negro
	ATCC 3369	ante/gris	pardo amarillento	ante/gris	amarillo
	ATCC 11009	negro	negro/amarillo	negro/amarillo	gris/verde
	ATCC 13989	naranja	amarillo	amarillo	incolore

25

30



1

TABLA VIII

Streptomyces olivaceus, Streptomyces fulvoviridis y especies afines - producción de pigmentos en medios de cultivo

5

10

15

20

25

30

Cultivo	Pigmentos no melanoides solubles				Producción de melanina [†]
	SS	YM	GA	OM	
ATCC 21379	-	-	-	+ amarillo pálido	-
ATCC 31126	-	-	-	-	-
ATCC 21380	-	-	-	-	-
ATCC 21381	-	-	-	-	-
ATCC 21382	-	-	-	-	-
NCIB 8238	+ marrón pálido	-	+ marrón pálido	+ marrón pálido	-
NCIB 8509	-	-	-	+ amarillo pálido	-
ATCC 21549	-	+ marrón pálido	+ rojo pálido/marrón	+ marrón pálido	-
ATCC 12019	-	-	-	-	-
ATCC 3335	-	-	-	-	-
ATCC 15863	-	-	-	-	-
ATCC 3320	+ rosa pálido	-	-	-	-
ATCC 3369	-	-	-	-	-
ATCC 11009	-	+ marrón pálido	-	-	-
ATCC 13989	-	+ naranja pálido	-	-	-

+ = producción de pigmento

- = no se produce pigmento

† ensayado sobre ágar peptona-levadura-hierro (ISP 6), ágar tirosina (ISP 17) y caldo de triptona-levadura (ISP 1)

TABLA IX

Streptomyces olivaceus, Streptomyces fulvoviridis y especies afines - ensayos de utilización de carbono

	<u>Cultivo</u>	<u>Ram- nosa</u>	<u>Rafi nosa</u>	<u>Saca rosa</u>	<u>Ino- sitol</u>	<u>Glu- cosa</u>	<u>Xi- losa</u>	<u>Fruc- tosa</u>	<u>Mani tol</u>	<u>Arabi- nosa</u>
1	ATCC 21379	+	-	-	±	+	+	+	+	+
	ATCC 31126	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	ATCC 21380	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	ATCC 21381	+	-	-	-	+	+	±	+	+
	ATCC 21382	±	+	-	-	+	+	+	+	+
5	NCIB 8238	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	NCIB 8509	+	±	-	-	+	+	+	±	+
	ATCC 21549	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	ATCC 12019	+	±	+	+	+	+	+	+	+
10	ATCC 3335	+	-	±	+	+	+	+	+	+
	ATCC 15863	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	ATCC 3320	+	-	±	-	+	+	+	+	+
	ATCC 3369	+	-	±	±	+	+	+	+	+
	ATCC 11009	+	-	-	+	+	+	+	+	+
15	ATCC 13989	-	+	+	+	+	+	+	+	-

+ indica que el compuesto es utilizado

- indica que el compuesto no es utilizado

± indica que la utilización es dudosa o muy escasa

EJEMPLO 3

Procedimiento preferido de aislamiento para la preparación

de MM 13902

Una reserva de esporas de S. olivaceus ATCC 31126 se mantiene en almacenamiento en tubos de tierra seca en un envase cerrado, con un desecador, a una temperatura de 20°C. Se transfiere una pequeña cantidad de la tierra de reserva

30

1 (aproximadamente 20 mg) asépticamente a un Erlenmeyer de
500 ml que contiene 100 ml del siguiente medio:

<u>Constituyente</u>	<u>Cantidad (g/litro)</u>
Monohidrato de glucosa	20,0
5 Harina de soja	10,0
Agua desionizada hasta	1 litro

El pH se ajusta a 6,5 antes de la esterilización.

La harina de soja es "Arkasoy 50" suministrada por la British
Arkady Co. Ltd., Old Trafford, Manchester, Inglaterra.

10 El matraz se incuba en un sacudidor rotatorio
(240 rpm) durante unas 30 horas a 28°C. Entonces se utilizan
2 ml del caldo vegetativo resultante para inocular un cultivo
inclinado de ágar sólido en una botella Roux. El medio de
ágar tiene la siguiente composición:

<u>Constituyente</u>	<u>Cantidad</u>
Jugo de vegetales V-8	20,0 ml
Agar	20,0 g
Agua desionizada hasta	1 l

El pH se ajusta a 6,0 antes de la esterilización.

20 (El jugo V-8 puede adquirirse de la Campbell's Soups Ltd.,
Kings Lynn, Norfolk, Inglaterra).

La inoculación se extiende sobre la superficie de
ágar haciendo oscilar el frasco que después se incuba de pie
a 30°C. Al cabo de 2 días de incubación, se separa mediante
25 una pipeta el exceso de líquido en el frasco y se continúa la
incubación durante otros 4 días.

Previamente se había encontrado que el desarro-
llo de actinofagos en el cultivo inclinado es suprimido si
se adopta este método de preparación del cultivo en el fras-
co Roux.
30

1

Se añaden 50 ml de agua desionizada esterilizada que contiene 0,02 % de Tween 80 a un cultivo en un frasco de Roux y las esporas se suspenden sacudiendo. Esta suspensión de esporas se añade después como inoculum a 75 litros de un medio esterilizado en fase de siembra contenido en un fermentador de acero inoxidable de 100 litros. La composición del medio de fase de siembra es la siguiente:

5

10

<u>Constituyente</u>	<u>Cantidad (g/l)</u>
Harina de soja ("Arkasoy 50")	10,0
Monohidrato de glucosa	20,0
Agua corriente hasta	1 litro

15

Para controlar la formación de espuma, se añaden al medio de fermentación, antes de la esterilización, 50 ml de "Fluronic I81" al 10 % en volumen/volumen en aceite de soja.

20

El medio se esteriliza a vapor en el fermentador durante 20 minutos a 120°C. El cultivo en fase de siembra se agita a 140 rpm con un agitador de disco de paletas de 7,5" (19,0 cm) de diámetro) y se introducen 75 litros/minuto de aire estéril a través de un rociador de extremo abierto.

25

La temperatura se controla a 28°C y después de incubar bajo estas condiciones durante 48 horas, el contenido de la vasija se agrega como inoculum a 1500 litros de un medio de fermentación estéril en un fermentador de acero inoxidable de 2000 litros, totalmente tabicado. El medio de fermentación tiene la siguiente composición:

30

<u>Constituyente</u>	<u>Cantidad (g/l)</u>
Harina de soja ("Arkasoy 50")	10,0
Monohidrato de glucosa	20,0
Greda (carbonato cálcico precipitado)	0,2

	<u>Constituyente</u>	<u>Cantidad (g/l)</u>
1	Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,001
	Sulfato sódico (anhidro)	1,0
	Agua corriente hasta	1500 litros
5	El pH se ajusta a 6,0 con hidróxido sódico antes de la esterilización. Antes de la esterilización, para evitar la formación de espuma, se añaden 3 litros de "Pluronic L81" al 10 % en aceite de soja. Después de esterilizar se ajusta el pH de nuevo a 7,0 con solución estéril de hidróxi-	
10	do sódico. La fermentación se agita a 106 rpm, estando provisto el eje del agitador de dos propulsores de disco de pa-	
	letas de 19" (48 cm) de diámetro. La temperatura se controla a 30°C y el caudal de aire a 1200 litros/minuto. La fermentación se cosecha al cabo de 60 horas y se clarifica por	
15	centrifugación.	
	Al material así producido se le asigna arbitrariamente una actividad de 340 unidades/ml. Los ensayos fueron determinados en la forma indicada en la Descripción 2.	
20	Se extraen 1050 l (340 unidades/ml) de filtrado del cultivo a 10°C y pH 8 con 310 l de diclorometano a 10°C con-	
	teniendo 1200 g de cloruro de cetildimetilbencilamonio, bombeando los 2 litros a caudales predeterminados a través de un	
25	mezclador incorporado. Se separan las fases en una centrifuga continua Sharples, habiendo sido mezcladas durante unos	
	2 minutos. La fase de diclorometano (300 l) se retroextrae con yoduro sódico acuoso. La retroextracción se realiza en	
30	cuatro lotes, utilizando un total de 7 l de agua conteniendo 210 g de yoduro sódico. Las fases se separan por la acción de la gravedad. La fase acuosa se ajusta desde pH 7,7	
	a pH 7,0 con ácido clorhídrico y se filtra. El extracto en yo-	

1 duro sódico (7 l) contiene 21.900 unidades/ml. Se prepara
una columna cambiadora de ión rellenando QAE Sephadex A25
(obtenido de Pharmacia Ltd) en solución reguladora de fosfa-
to a pH 7 (0,05M) conteniendo cloruro sódico (0,3M) en una co-
5 lumna de vidrio de 10 cm de diámetro, hasta una altura de
40 cm. El extracto en yoduro sódico (7 l) es percolado a
50°C a través del QAE Sephadex a 50 ml/minuto. La columna se
eluye con NaCl 0,7M en solución reguladora de fosfato 0,05M
también a pH 7, a 50°C y a un caudal de 25 ml/minuto. Se des-
10 precian 2 l de eluato y se recogen 90 fracciones (100 ml).
Las fracciones se estudian en un espectrofotómetro ultravioleta
y las fracciones que presentan un máximo de absorción
a 305 nm aproximadamente se reúnen y se ajustan a pH 7
(fracciones 50-62, volumen reunido 1440 ml, 71.000 unidades
15 /ml). Previamente se ha demostrado que las fracciones con
un máximo en esta región contienen MM 13902.

Se añade cloruro sódico (5 g/100 ml) a las fracciones
reunidas que después son percoladas a 50°C a través de una co-
luna de 6,3 cm de diámetro rellena con resina Amberlite XAD
20 4, (suministrada por Rohm and Haas Ltd) hasta una altura de
30 cm, a un caudal de 20 ml/minuto. El MM 13902 es adsorbido
sobre la resina bajo estas condiciones mientras que las im-
purezas inorgánicas no lo son. El MM 13902 se eluye a la
temperatura ambiente con agua destilada (200 ml) seguido de
25 metanol acuoso al 50 %. Se evapora el eluato (1 l) por deba-
jo de 30°C bajo presión reducida hasta 70 ml, se ajusta a
pH 7 y se liofiliza hasta formar 1,62 g de un sólido pardo que
es una sal parcialmente purificada de MM 13902 con una acti-
vidad de 37.000 unidades/mg.

30 La sal disódica de MM 13902 parcialmente purificada

1 (1,0 g, 37.000 unidades/mg) se cromatografía sobre una colum-
na de celulosa (3,8 cm x 30 cm; celulosa Whatman CC31) eluida
con n-propanol/agua (4:1 en volumen/volumen) a un caudal de
2,5 ml/minuto. Se desprecian 170 ml de eluato y se recogen
5 100 fracciones de 15 ml. Se reúnen las fracciones que contie-
nen la sal disódica de MM 13902 (números 37-43) determinado
por absorción ultravioleta (89 ml), se evaporan por debajo
de 30°C bajo presión reducida para separar el n-propanol y
se liofilizan para dar 219 mg de un polvo amarillento con
10 una actividad de 73.000 unidades/mg.

El material anterior presenta un máximo de absorción
ultravioleta a 308 nm aproximadamente, con un ϵ $\frac{1}{1 \text{ cm}}$ de 343
aproximadamente. Este material tiene los espectros infrarro-
jo y de resonancia magnética nuclear indicados en las Figuras
15 2 y 3, respectivamente. La actividad antibacteriana del mate-
rial se encuentra en la Tabla X. El análisis elemental de es-
te material indica que contiene, entre otros, nitrógeno, azu-
fre y sodio, probablemente en la relación N:S:Na de 2:2:2.
Los máximos positivos y negativos de las curvas de dicroísmo
20 circular para la sal disódica de MM 13902 fueron determinados
en un espectropolarímetro registrador Cary-61 a concentracio-
nes de 0,37 mg/ml, para una longitud de la trayectoria de
1 cm; los resultados fueron los siguientes:

λ (nm)	$\Delta E/m$
186	+ 67,24 x 10 ⁻⁴
221	- 67,24 x 10 ⁻⁴
286	- 3,3 x 10 ⁻⁴
323	- 8,2 x 10 ⁻⁴

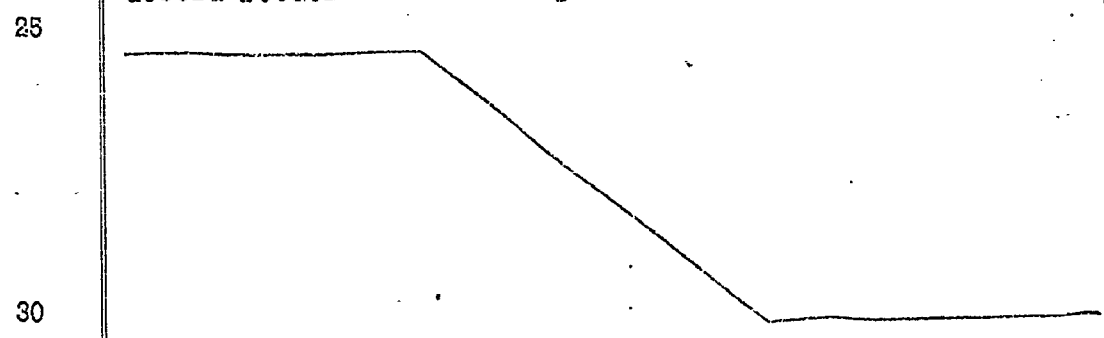
30

TABLA X

Actividad antibacteriana de la sal disódica de MM 13902 (método del microtítulo - inóculo pesado, caldo de una noche 1/100)

Organismo	CMI (µg/ml)
<u>Bacillus subtilis</u> A	0,15
<u>Staph. aureus</u> Oxford	0,3
<u>Staph. aureus</u> Russell	0,6
<u>Strep. Faecalis</u>	3,1
<u>Enterobacter cloacae</u> N1	2,5
<u>E. coli</u> 10418	0,15
<u>E. coli</u> JT410	5...
<u>Kleb. aerogenes</u> A	0,03
<u>Proteus Mirabilis</u> 13	0,6
<u>Proteus vulgaris</u> WO 90	0,6
<u>Prov. Stuartii</u>	0,07
<u>Ps. aeruginosa</u> A	50 ...
<u>Salmonella typhimurium</u> CT 10	0,3
<u>Serratia marcenses</u> US 39	2,5
<u>Shigella sonnei</u>	0,6 - 0,3
<u>Haemophilus influenzae</u> PG	0,08
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	0,08

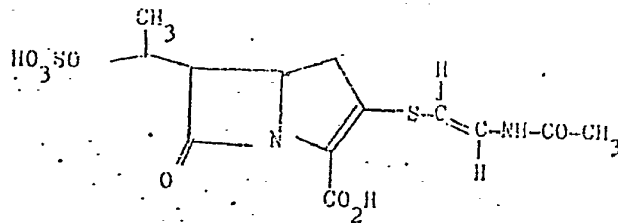
En resumen, La Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:



REIVINDICACIONES

1 1. Un procedimiento para la preparación de una sal sustancialmente pura de un compuesto ácido carboxílico antibacterial, ente activo designado como MM 13902, cuya sustancia MM 13902 tiene la fórmula

5



10

cuyo procedimiento consiste en separar por cromatografía una solución que contiene la MM 13902 y otros agentes antibacterianos en fracciones que consisten esencialmente en una sal de MM 13902 y otras fracciones y aislar la sal de MM 13902 de la solución.

15

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la separación se logra utilizando una solución acuosa de un electrolito ajustado hasta pH aproximadamente neutro y se utiliza una combinación con un material de soporte polar.

20

3. Un procedimiento según la reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la separación se logra utilizando una solución acuosa de cloruro de sodio ajustado a un pH de 7, en combinación con un material de soporte conteniendo grupos amino terciarios o cuaternarios.

25

4. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la separación se logra utilizando un sistema disolvente formado por una mezcla de agua con un alcohol inferior en combinación con un material de soporte inerte.

30

5. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4,

1 caracterizado porque el sistema disolvente es una mezcla de
agua e isopropanol y el material de soporte inerte es gel de
silice o celulosa.

5 6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindica
ciones 1 a 5, caracterizado porque la solución que contiene
MM 13902 y otros agentes antibacterianos se prepara mediante
el cultivo de Streptomyces olivaceus ATCC 21379, 21380, 21381,
21382 ó 31126 en presencia de fuentes asimilables de carbono,
10 nitrógeno, azufre y sales minerales en un medio nutritivo sólido o semi-sólido o en un medio líquido en el cual los nutrientes se disuelven o suspenden a una temperatura de 28[±]2^oC durante 2 o 3 días y posteriormente se extractan los agentes antibacterianos presentes del medio de cultivo, ya sea por absorción inicial y después mediante elución del carbón
15 activo o una resina de intercambio de ión conteniendo grupos amino terciarios o grupos amonio cuaternarios o mediante extracción en una solución de una sal de amonio lipofílica en un disolvente no miscible en agua a una temperatura no superior a 20^oC,

20 7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 adaptadas para la preparación de una sal de MM 13902 que es por lo menos 80 % pura.

25 8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, adaptadas para la preparación de una sal dibásica de MM 13902 donde M es sodio o potasio.

9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 adaptadas para la preparación de sales de di-sodio o di-potasio de MM 13902.

30 10. Se reivindica por último como objeto sobre el que

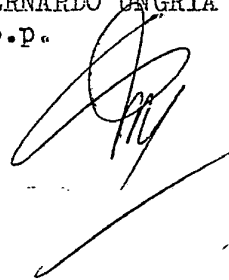
1 ha de recaer la patente de invención que se solicita: UN PRO
CEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA SAL SUSTANCIALMENTE PU
RA DE UN COMPUESTO ACIDO CARBOXILICO ANTIBACTERIALMENTE ACTI
VO.

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre-
sente memoria descriptiva que consta de cincuenta y cuatro
páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

Madrid, 26 Marzo de 1975.

BERNARDO UNGRIA

p.p.



10

15

20

25

30

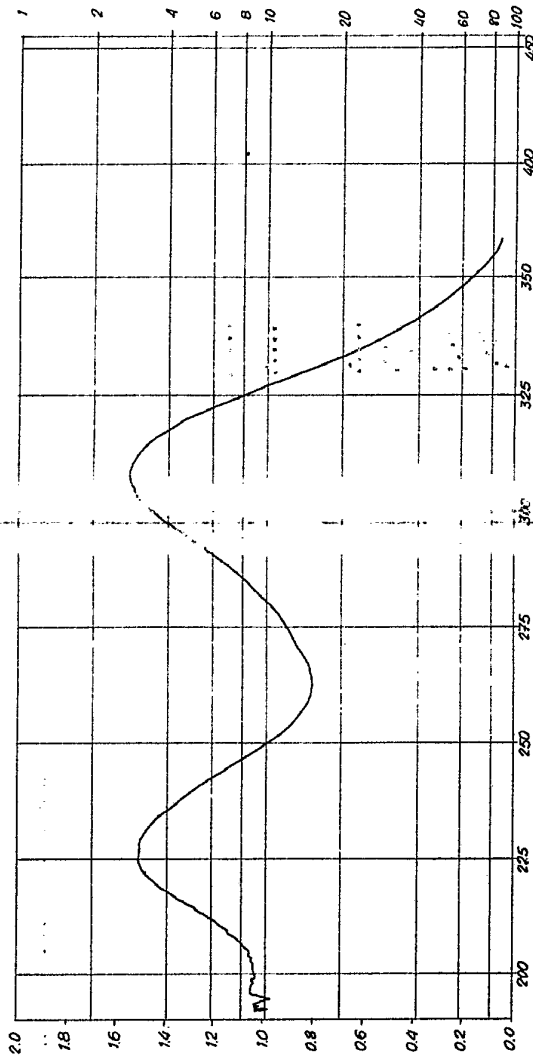


FIG-1

ESCALA VARIABLE
 Madrid, 26 de Mayo de 1975
 BERNARDO LUGERIA
 P. P.

**POOR
 QUALITY**

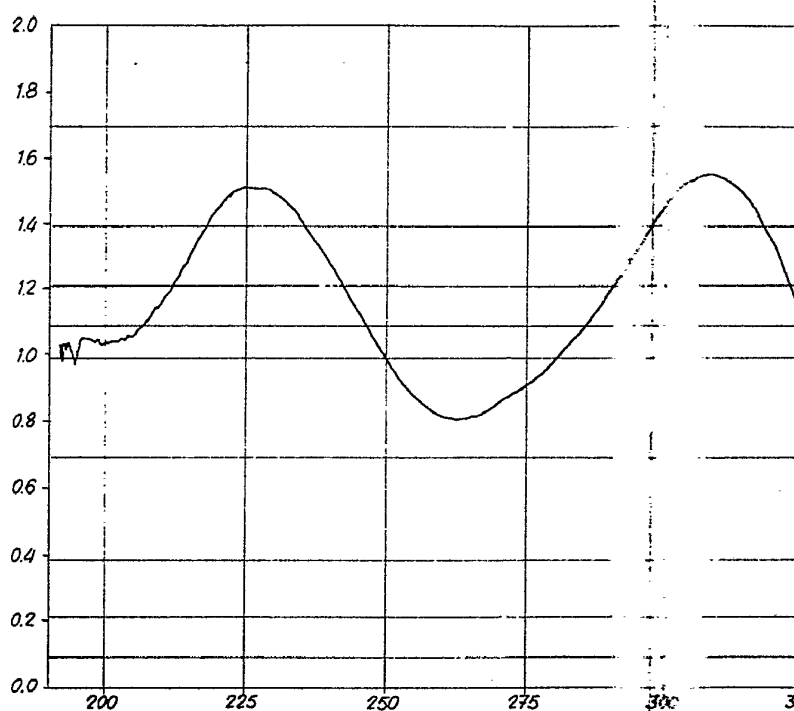
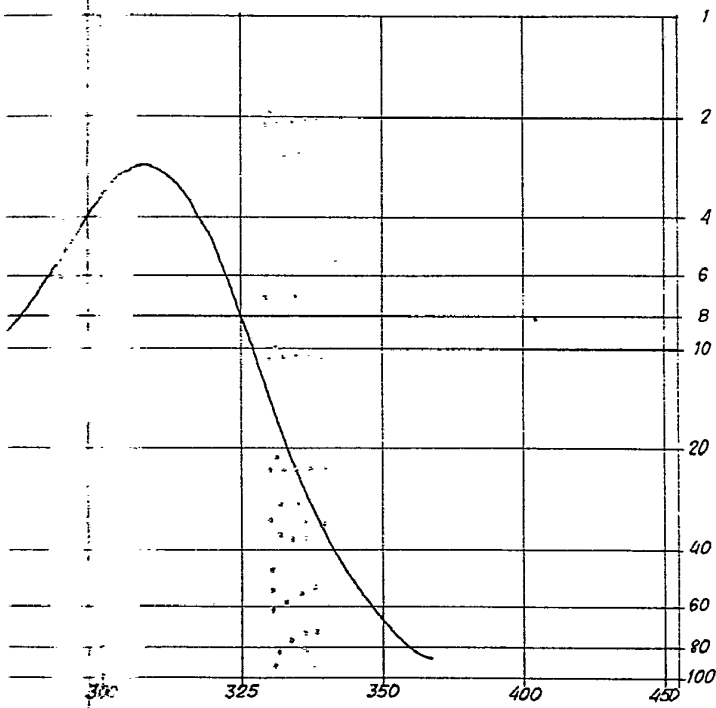


FIG-1

**POOR
QUALITY**



IG-1

ESCALA VARIABLE

Madrid, 26 de Marzo de 1975

BERNARDO UNGRIA

P. P.

**POOR
QUALITY**

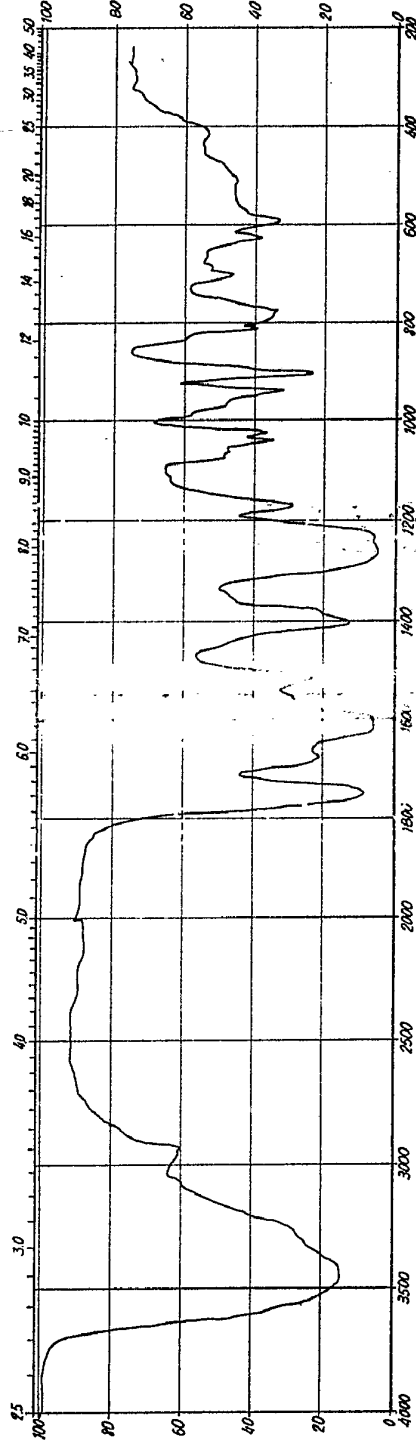



FIG-2

ESCALA VARIABLE
 Madrid, 26 de Marzo de 1975
 BERNARDO UNGRIA
 P. P.



POOR QUALITY

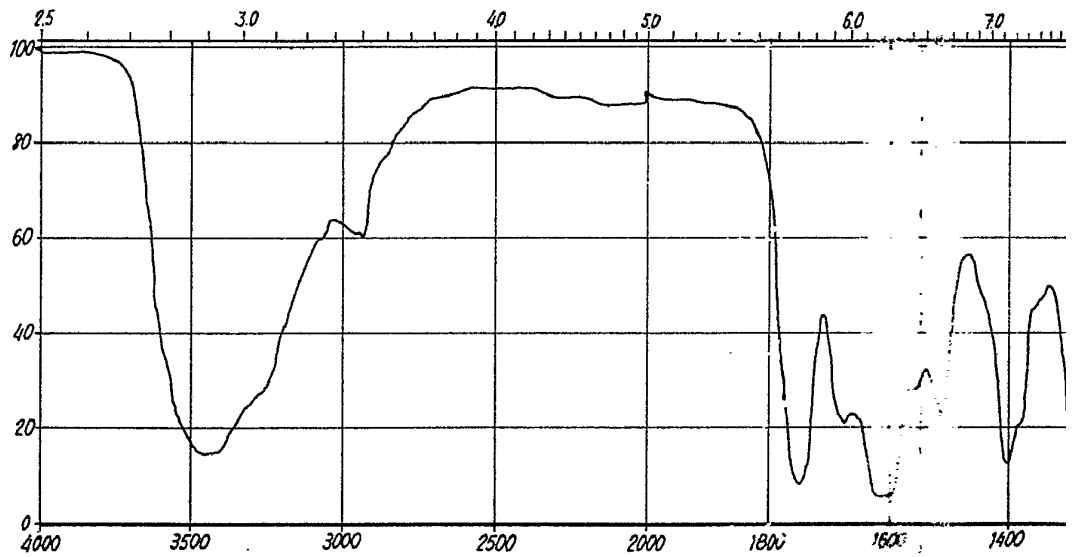
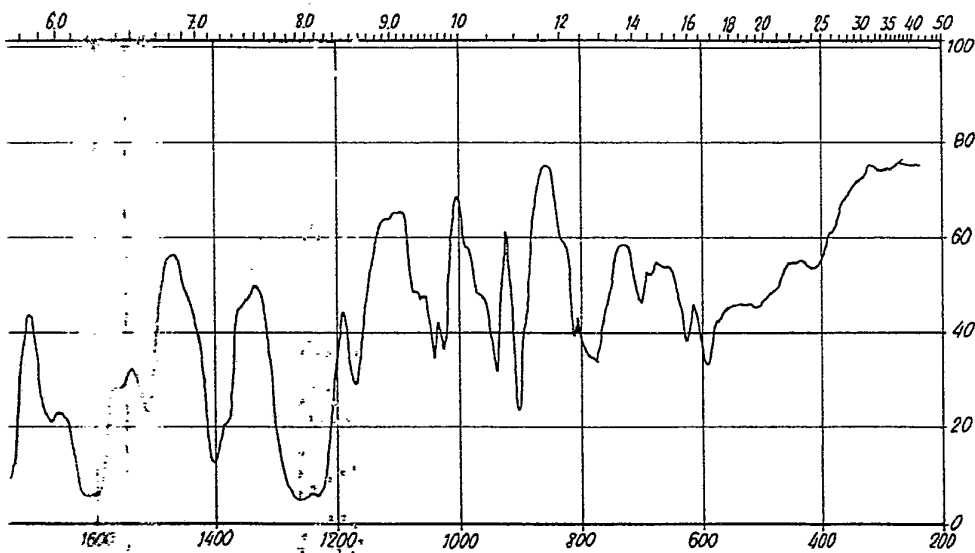


FIG - 2

**POOR
QUALITY**



IG-2

ESCALA VARIABLE

Madrid, 26 de Marzo de 1975

BERNARDO UNGRIA

P. P.

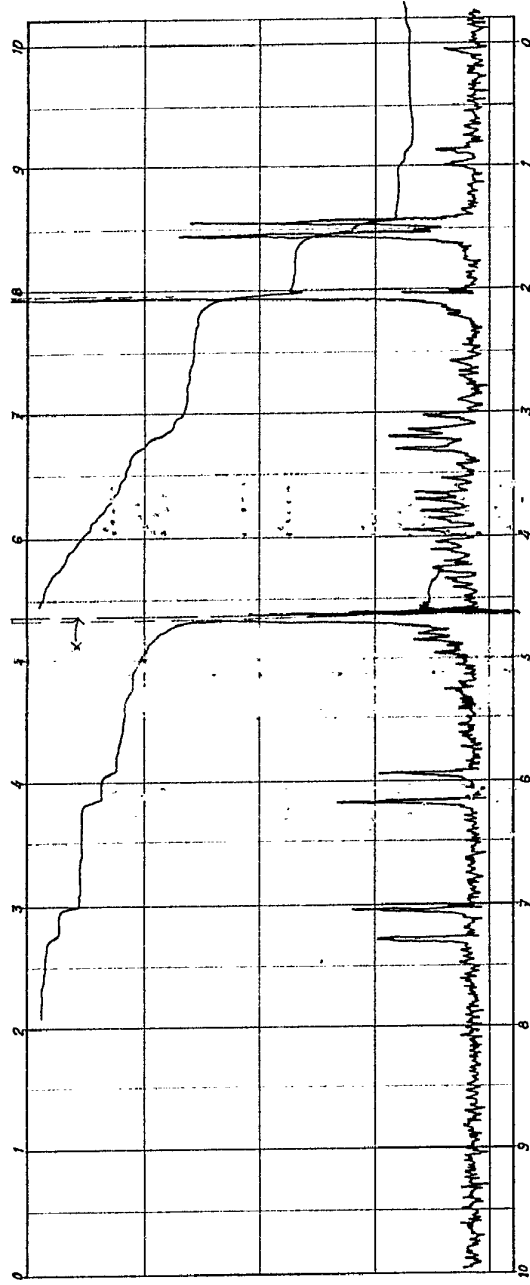


FIG-3

ESCALA VARIABLE
Madrid, 26 de Marzo de 1975
BERNARDO UNGRIK
P. P.

**POOR
QUALITY**

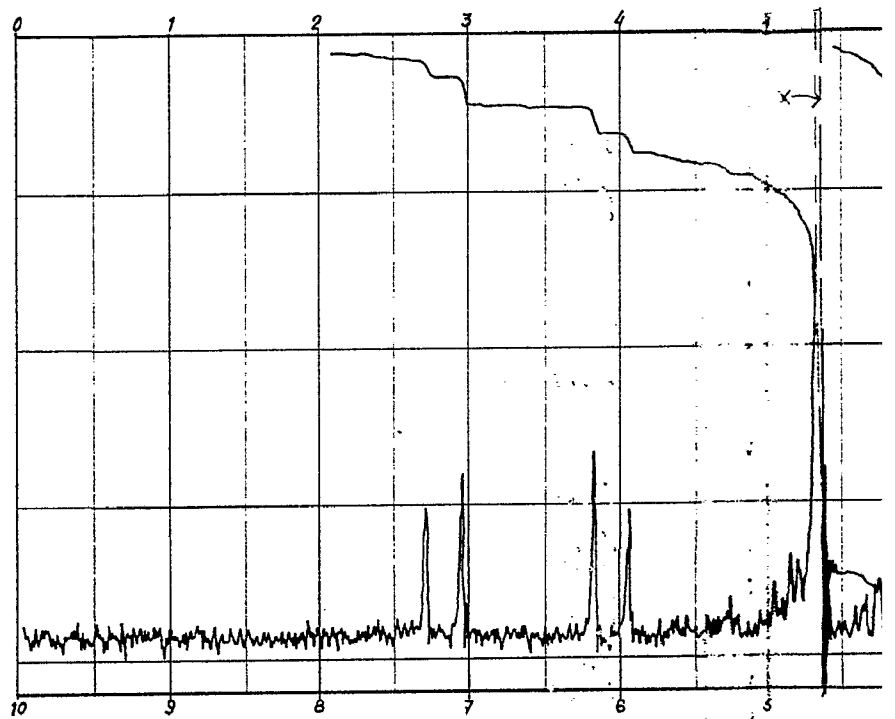
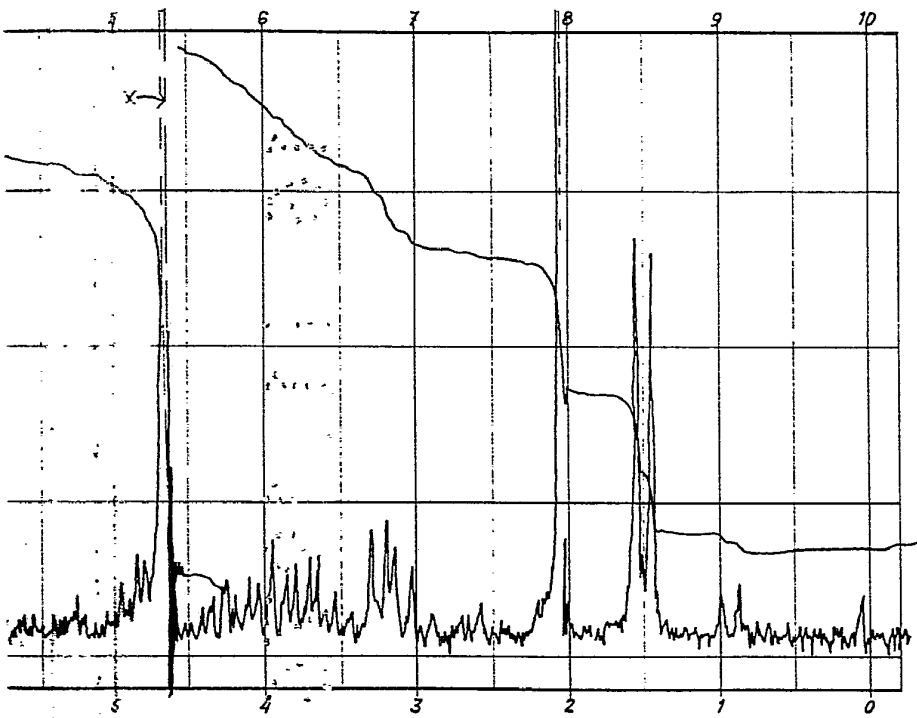


FIG - 3

**POOR
QUALITY**



G-3

ESCALA VARIABLE

Madrid, 26 de Marzo de 1975
BERNARDO UNGRIA
P. P.

POOR
QUALITY