

440,543

Esta solicitud es una divisional de la
solicitud de patente española nº 415.221
del 25 de Mayo de 1.973.

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ABBOTT LABORATORIES y
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

RESIDENCIA: 14 th Street & Sheridan Rd., NORTH
CHICAGO, Illinois, Estados Unidos y
Ohtemachi Building, Ohtemachi, Chiyoda-ku,
TOKYO, Japón.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION
DE UN ANTIBIOTICO PERTENECIENTE AL
COMPLEJO GENTAMICINA C"

Prioridad: Patente n.º del

Int. Cl.: C12D

1 Debido a su carácter, que será descrito con más de-
talle más adelante, se cree que el nuevo antibiótico pertene-
ce al complejo gentamicina.

5 La producción del antibiótico básico gentamicina es-
tá descrita en la patente estadounidense nº 3.091.572. Así,
se sabe que la gentamicina, así como dos fracciones adiciona-
les, identificadas como fracción A y fracción B, puede ser
producida por microorganismos que pertenecen a la especie
10 Micromonospora echinospora y Micromonospora purpurea. Otros
investigadores han determinado que el complejo gentamicina
contiene otros seis componentes adicionales. "Separation,
Structural y Physical Studies o de Gentamicin C Complex",
Kershner, Rutgers, State University of New Jersey, 1971. Es-
tos seis componentes son denominados C₁, C_{2a}, C₂-I, C₂-II,
15 C₂-III y C_{1a}.

 El antibiótico de esta invención está estrechamente
relacionado con la fracción C_{2a}, pero debido a importantes di-
ferencias en el espectro de resonancia magnética nuclear, que
serán descritas con más detalle más adelante, el antibiótico de
20 esta invención se considera diferente de la fracción C_{2a} cono-
cida en la técnica anterior.

COMPENDIO DE LA INVENCION

 De acuerdo con esta invención, el antibiótico XK-62-2
es producido por fermentación de microorganismos pertenecien-
tes al género Micromonospora en un medio nutritivo adecuado
y después aislamiento del antibiótico específico. En este
25 aspecto, los inventores han aislado una nueva especie del gé-
nero Micromonospora que produce fácilmente el antibiótico. El
cultivo tipo ha sido denominado Micromonospora sagamiensis MK
30 65 y dos variedades que también han sido identificadas han si-

1 do denominadas Micromonospora sagamiensis var. nonreducans
MK-62 y Micromonospora sagamiensis var. flava Mm 628. Estas
tres variedades han sido depositadas en la American Type Cul-
5 ture Collection, Rockville, Maryland y han recibido los núme-
ros de accesoión 21826, 21803 y 21827, respectivamente. Las va-
riedades presentan las siguientes propiedades:

I. Morfología:

Se forman micelios de substrato no septados, ramifica-
dos y bien desarrollados, con un diámetro de aproximadamente
10 0,5 μ , pero no se forma un verdadero micelio aéreo. Se for-
man esporas muy bien y se producen esporas simples en los ex-
tremos de esporoforos simples (de 1,0-2,0 μ de longitud) ra-
mificados desde los micelios del substrato. Se forman muchas
esporas alrededor de los extremos de los micelios del substrato.
15 Las esporas maduras tienen un diámetro de 1,0 μ aproximada-
mente y son de forma oval o esférica con una superficie áspe-
ra.

II. Características de cultivo sobre diversos medios:

Variedad MK 65: El crecimiento es pardo sobre medios
20 de ágar bien desarrollados, formando muchas esporas pero es
naranja sobre medios de pobre desarrollo sobre los que se for-
man escasamenté algunas esporas. Algunas veces el tono de co-
lor varía con el medio.

Variedad Mm 628: El crecimiento es muy pobre en me-
25 dios sintéticos ordinarios y crece bien solamente sobre me-
dios naturales formando una capa de esporas. El tono de color
es claramente diferente del de la variedad MK-65 en todos los
medios, presentando un color entre mostaza y trigo claro.
30 Cuando madura, el crecimiento es de parduzco a negruzco debi-
do al color de las esporas y algunas veces grisáceo.

1 Variedad MK 62: Generalmente se producen muchas es-
 5 poras sobre medios de ágar que crecen bien, en los cuales el
 crecimiento es en su mayor parte pardo oscuro. Sin embargo,
 el crecimiento es naranja sobre los medios de crecimiento
 10 pobre y las esporas no se forman fácilmente. Además, se for-
 ma una espora negra en los medios de ágar sobre los que el
 crecimiento de los micelios del substrato es pobre pero las
 esporas se forman fácilmente. En los medios líquidos, el cre-
 cimiento es naranja debido al color del medio de substrato.

15 Las características del cultivo en diversos medios
 después de cultivar a 27°C durante dos semanas se encuentran
 en la Tabla I. Las indicaciones de color se dan de acuerdo
 con las clasificaciones en el Color Harmony Manual (Container
 Corporation of America).

15 TABLA I

Variedades Medio	<u>Micromonospo- ra sagamien- sis var. non- reducans MK 62</u>	<u>Micromonos- pora saga- miensis MK 65</u>	<u>Micromonospo- ra sagamien- sis var. Fla- va Mm 628</u>
Agar de Czapek	C: moderado, plano	C: moderado, plano	C: pobre
	S: amarillo me lón brillan te (3 ia) a pardo oscu- ro (3 pn)	S: albarico- que (4 ga) a pardo os- curo (4 nl)	
	PS: ninguno	PS: ninguno	
Agar glucosa- asparaguina	C: moderado, plano	C: pobre a mo- derado, plano	C: pobre
	S: alcana rojo ladrillo (5 ng)	S: rojo teja (5 ne)	
	PS: ninguno	PS: ninguno	
Agar nutriente	C: pobre a mo- derado, plano	C: pobre a mo- derado, plano	C: pobre a modera- do plano

1

TABLA I (continuación)

Variedades	Micromonospora sagamiensis var. nonreducans MK 62	Micromonospora sagamiensis MK 65	Micromonospora sagamiensis var. Flava Mm 628
Medio			
5 Agar nutriente	S: naranja (4 la) PS: ninguno	S: oro claro (2 ic) PS: ninguno	S: trigo claro (2 ea) PS: ninguno
Medio			
10 Agar albúmina de huevo	C: pobre, plano, capa de esporas negras	C: pobre a moderado, plano S: marrón cacao (5 lg) PS: ninguno	C: pobre
Agar almidón	C: moderado, granular S: marrón cobrizo claro (5 pg) PS: ninguno	C: moderado, granular S: marrón intenso (4 pl) PS: ninguno	C: pobre
15 Agar extracto de malta-extracto de levadura	C: moderado, levantado	C: moderado, granular	C: bueno, levantado, acanalado
20 Agar harina de avena	S: marrón intenso (5 pl) PS: ninguno	S: castaño (4 ni)	S: pardo mostaza (2 pl) a negro PS: ninguno
25 Agar harina de avena	C: pobre, plano	C: pobre, plano	C: pobre
Agar dextrosamina NZ (1:3)	S: naranja (4 la) PS: ninguno	S: naranja (4 la) PS: ninguno	S: pardo mostaza (2 pl) a negro PS: ninguno
30 Agar dextrosamina NZ (1:3)	C: moderado, levantado S: color cuero (4 ne)	C: moderado, plano S: amarillo brillante (3 la)	C: pobre, granuloso S: trigo claro (2ea)

TABLA I (continuación)

	Variedades Medio	Micromonospora sagamiensis var. nonreducans MK 62	Micromonospora sagamiensis MK 65	Micromonospora sagamiensis var. Flavva Mm 628
1				
5	Agar dextrosamina NZ (1:3)	PS: ninguno	PS: ninguno	PS: ninguno
	Agar de Bennett	C: moderado, levantado, acanalado S: naranja polvoriento (4 lc)	C: moderado, granular S: color rosable (4 pi)	C: moderado, plano S: pardo mostaza (2 pi)
10	Agar de Emerson	PS: ninguno C: pobre, plegado multi ple S: naranja brillante (4 na)	PS: ninguno C: pobre a moderado, granular S: naranja (4 la)	SP: ninguno C: moderado, granular S: amarillo melón brillante (3 ia)
15	Agar glucosa-extracto de levadura	PS: ninguno C: moderado, levantado S: naranja brillante (4 na)	PS: ninguno C: moderado, granular S: naranja bermejo (4 nc)	PS: ninguno C: moderado, granular S: pardo mostaza (2 pi)
20		PS: ninguno	PS: ninguno	PS: ninguno

C: crecimiento; S: color del micelio del substrato; PS: pigmento soluble.

III. Propiedades fisiológicas:

Las propiedades fisiológicas de las variedades MK 62, MK 65 y Mm 628 se encuentran en la Tabla II. La temperatura óptima es determinada al cabo de 5 días de cultivo y la acción sobre la leche y sobre la descomposición de la celulosa son observadas después de un mes de cultivo. Las otras observaciones se realizan sobre un cultivo a 27° durante 2 semanas.

30

1

TABLA II

	<u>Propiedades fisiológicas</u>	<u>Micromonospora sagamiensis var. nonreducans MK 62</u>	<u>Micromonospora sagamiensis MK 65</u>	<u>Micromonospora sagamiensis var. flavva Mm 628</u>
5	Licuefacción de la gelatina	-	+	+
	Licuefacción de la leche	-	+ (lentamente)	+ (lentamente)
	Coagulación de la leche	-	-	-
	Descomposición de la celulosa	+	+	+
10	Hidrólisis del almidón	+	+	+
	<u>Utilización de fuentes de carbono</u>			
	D-arabinosa	-	-	+
15	D-galactosa	++	+	+
	D-glucosa	++	++	++
	Glicerol	-	-	-
	D-lactosa	-	-	-
	Levulosa	++	+	-
20	L-inositol	-	-	-
	D-manitol	-	-	-
	D-rafinosa	-	-	-
	L-ramnosa	-	-	-
	D-xilosa	++	++	++
	Sacarosa	+	+	+
25	pH de crecimiento óptimo	7,0-8,0	7,0-8,0	7,0-8,5
	Temperatura de crecimiento óptimo	35-40°C	30-40°C	30-40°C
	Reducción de nitrato	-	+	-
	Formación de tiro-sinasa	-	-	-
30	Formación de melanoide	-	-	-

1 Como las variedades MK-65 y Mm 628 no forman ver-
daderos micelios aéreos y forman una sola espora sobre los
micelios del substrato, estas variedades se consideran per-
tenecientes al género Micromonospora. Los microorganismos
5 conocidos del género Micromonospora pueden ser clasificados
en cuatro grupos basándose en el color del micelio, a saber:
grupo naranja, grupo rojo violáceo, grupo verde azulado y gru-
po marrón. A la vista de las diferencias del tono de color y
de otras diferencias establecidas en las anteriores Tablas I
10 y II, se determinó que las variedades MK-62, MK-65 y Mm 628
pertenecían a una nueva especie del género Micromonospora.

 La variedad MK-65 fué elegida como cultivo tipo
y fué denominada Micromonospora sagamiensis debido a que ha-
bía sido aislada de un terreno forestal de los suburbios de
15 Sagamihara-shi, Kanagawa-ken, Japón. La variedad MK-62 pre-
senta propiedades muy similares a las de la variedad MK-65,
excepto una diferencia en la reducción del ácido nítrico, licua-
ción y coagulación de leche y color del micelio en diversos
medios. Por consiguiente, la variedad MK-62 ha sido conside-
20 rada como una variante del cultivo tipo y denominada Micromo-
nospora sagamiensis var. nonreducans, debido a que no reduce
al ácido libre. La variedad Mm 628, por otra parte, es dife-
rente de las dos primeras en que el crecimiento generalmente
es más pobre y en un medio de ágar su color es de pardo mos-
25 taza a trigo claro y utiliza D-arabinosa pero no levulosa.
Por consiguiente, esta variedad también se consideró una va-
riante del cultivo tipo y fué denominada Micromonospora
sagamiensis var. flava debido a su tono de color amarillo.

 Además de producir el antibiótico XK-62-2, tam-
30 bién se ha encontrado que los miembros de esta nueva especie,

1 antes descritos, producen otros antibióticos como los clasificados como pertenecientes al complejo gentamicina C. Por consiguiente, esta invención también comprende el nuevo procedimiento de producción de estos últimos antibióticos.

5 También hemos encontrado que algunas otras variedades pertenecientes al género Micromonospora producen el antibiótico XK-62-2, a saber: Micromonospora echinospora ATCC 15837, Micromonospora echinospora var. ferruginea NRRL 2995, Micromonospora echinospora var. pallida NRRL 2996, 10 ATCC 15836, ATCC 15838 y Micromonospora purpurea NRRL 2953, ATCC 15835. Estas variedades están totalmente descritas en la patente estadounidense nº 3.091.572 (publicación de patente japonesa nº 21394/69) y se sabe que producen el antibiótico gentamicina. Sin embargo, hasta ahora no se había observado que estas variedades producían el antibiótico de esta 15 invención. Las variedades citadas están depositadas en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. De hecho un mutante MK-62-164 (ATCC 21949) se derivó a partir de MK-62 y el mutante produce de forma característica 20 XK-62-2.

Como ocurre con otras variedades de actinomicetos, los microorganismos que son útiles en esta invención pueden experimentar mutaciones por medios artificiales tales como radiación con luz ultravioleta, radiación con Co^{60} , radiación con rayos X y diversos productos químicos inductores de 25 mutaciones. Por consiguiente, cualquier variedad, incluso aunque esté mutada, puede ser utilizada en esta invención siempre que pueda producir el antibiótico XK-62-2.

30 Generalmente pueden emplearse los métodos convencionales de cultivo de los microorganismos del género actino

1 micetos en el procedimiento de esta invención. En el medio de
cultivo pueden emplearse diversas fuentes nutrientes. Como
fuente de carbono puede utilizarse la glucosa, el almidón,
5 manosa, fructosa, sacarosa, dextrina, melazas, etc, solas o
en combinación. Además, pueden utilizarse hidrocarburos, al
coholes, ácidos orgánicos, etc, según la capacidad de utili-
zación que presente el microorganismo. Las fuentes de nitróge-
no orgánicas e inorgánicas como cloruro amónico, sulfato amó-
nico, urea, nitrato amónico, nitrato sódico, etc y las fuen-
10 tes de nitrógeno naturales como peptona extracto de carne, ex-
tracto de levadura, levadura seca, licor de infusión de maíz,
harina de soja, casaminoácido, proteína vegetal soluble, etc,
pueden ser utilizadas solas o en combinación. Además pueden
agregarse al medio, si es necesario, sales inorgánicas como
15 cloruro sódico, cloruro potásico y carbonato y fosfato cálcico.
Además pueden agregarse adecuadamente materias orgánicas o
inorgánicas capaces de provocar el crecimiento del microorga-
nismo.

20 El más adecuado para este procedimiento es un mé-
todo de cultivo líquido, especialmente un método de cultivo
agitado y sumergido. La temperatura de cultivo está compren-
dida entre 25°C y 55°C y es conveniente llevar a cabo el cul-
tivo a un pH aproximadamente neutro.

25 El antibiótico de esta invención se forma y acu-
mula en el líquido de cultivo habitualmente al cabo de 1 a 12
días de cultivo. Cuando el rendimiento de XK-62-2 en el líqui-
do de cultivo alcanza un valor máximo, se interrumpe el cul-
tivo y el producto deseado se aísla y purifica del líquido
de cultivo después de que las células microbianas han sido
30 separadas, por ejemplo por filtración.

El aislamiento y la purificación del antibiótico

1 del filtrado se lleva a cabo por los métodos de aislamiento
utilizados en el aislamiento y purificación de los productos
metabólicos microbianos del líquido de cultivo.

5 Como el XK-62-2 es básico y muy soluble en agua
pero escasamente soluble en los disolventes orgánicos habi-
tuales, el producto deseado puede ser purificado por los mé-
todos habitualmente empleados para la purificación de los llama-
dos antibióticos básicos solubles en agua. Más específica-
mente, el XK-62-2 puede ser purificado mediante una combina-
10 ción adecuada de adsorción y desorción de una resina cambia-
dora de catión y carbón activo; cromatografía en columna em-
pleando celulosa, Sephadex LH-20 y gel de sílice y métodos-
similares. Como la base libre de esta sustancia es soluble
en acetona y el sulfato es escasamente soluble en metanol, la
15 sustancia deseada puede ser disuelta y precipitada combinan-
do adecuadamente estas propiedades.

Por ejemplo, el filtrado del cultivo es ajustado
en primer lugar a un pH de 7,5 y después sometido a adsorción
sobre una resina cambiadora de catión IRC-50 (forma NH_4^+). Des-
20 pués de lavar con agua, se eluye con amoníaco acuso 1N. La frac-
ción activa se concentra a presión reducida. Después el concen-
trado se trata con una resina cambiadora de anión, Dowex 1x2
(forma OH^-) y se concentra de nuevo a presión reducida. El con-
centrado se ajusta a un pH de 10,5 aproximadamente y se aña-
25 de al mismo 5 volúmenes de acetona. El precipitado resultante
se separa por filtración y el filtrado se concentra y ajusta
a pH 4,5 con ácido sulfúrico. A este concentrado se añaden
5-10 volúmenes de metanol. El precipitado se recupera por fil-
tración y se seca a vacío. Se obtiene un polvo crudo blanco.

30 El polvo crudo así obtenido se disuelve en la capa
inferior de una mezcla disolvente de cloroformo, isopropanol

1 y amoníaco acuoso (2:1:1) y la solución resultante se somete
a cromatografía en columna de gel de sílice. La elución se
realiza con el mismo disolvente y a un caudal de aproximada-
mente 30 ml/hora. Se recogen las fracciones de XK-62-2 y se
5 concentran a presión reducida. Después de liofilizar el con-
centrado, se obtiene una base libre blanca del antibiótico.
Alternativamente, el concentrado de la fracción activa se ajust
ta a pH 4,5 con ácido sulfúrico y después se somete a filtra-
ción. Después de liofilizar el filtrado, se obtiene un sulfato
10 blanco de XK-62-2.

EL ANTIBIOTICO

La base libre del antibiótico XK-62-2 es un pol-
vo básico blanco. El análisis elemental revela las siguien-
tes proporciones: C, 51,90 %; H, 8,81 %; N, 15,18 % y O,
15 24,11 % (por diferencia). El punto de fusión del sulfato es
260°C (con descomposición). La rotación específica de la ba-
se libre es $[\alpha]_D^{20} = +116^\circ$ (c = 1, H₂O).

La Figura 1 ilustra el espectro de absorción ul-
travioleta de una solución acuosa de XK-62-2. Este no presen-
ta ningún máximo de absorción característico entre 220 y 360
20 mμ y solamente presenta absorciones terminales.

La Figura 2 ilustra el espectro de absorción in-
frarrojo del antibiótico (pastilla de KBr). Como se observa
en la figura, el XK-62-2 presenta picos a las siguientes lon-
25 gitudes de onda expresadas en cm⁻¹:

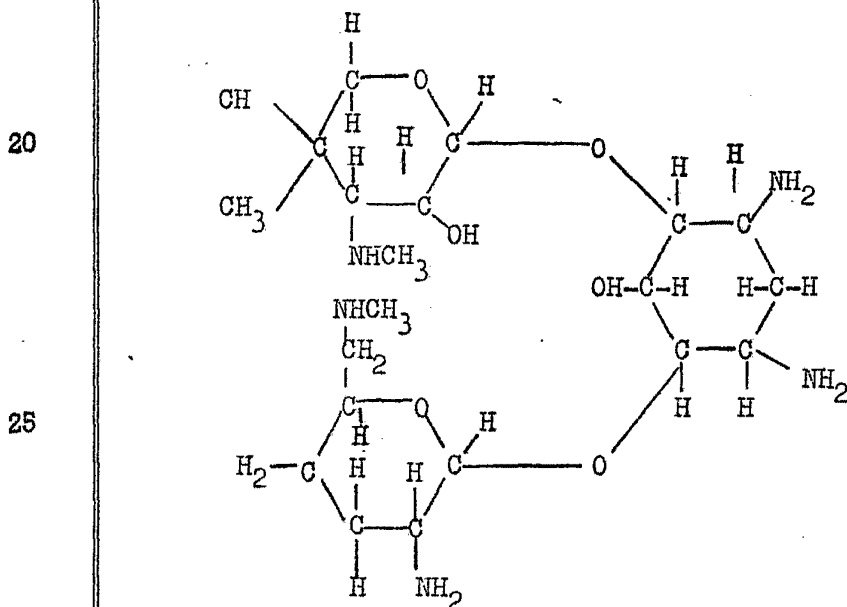
610, 1040, 1110, 1285, 1340, 1390, 1460, 1510,
1620, 2050, 2920, 3030, 3350.

El espectro RMN del sulfato de XK-62-2 está ilus-
trado en la Figura 3. El espectro RMN se mide con un espec-
30 trómetro Varian Associates HA-100 después de haber sustituido

1 los átomos de hidrógeno del XK-62-2 por átomos de deuterio
mediante liofilizaciones repetidas en agua pesada. Las absor-
ciones a 5,60 ppm y 6,32 ppm están determinadas sobre el pro-
tón anomérico del azúcar constituyente. Las absorciones de
5 los grupos N-metilo y C-metilo terciario están confirmadas
respectivamente a 3,38 ppm y 1,80 ppm. Característicamente
se observa otra absorción del grupo N-metilo a 3,21 ppm con
una diferencia de 0,17 ppm de 3,38 ppm.

Como resultado de la medida del espectro de masas
10 utilizando un aparato con un alto poder de resolución, se
determina que el XK-62-2 tiene un ión molecular $(M+1)^+$ de
464, por lo tanto un peso molecular de 463 y una fórmula mo-
lecular de $C_{20}H_{41}N_5O_7$. Por consiguiente, los valores analíti-
cos elementales calculados son: C, 51,84 %; H, 8,86 %; N,
15 15,12 % y O, 24,19 %.

Basándose en los datos anteriores, se atribuye la
siguiente fórmula estructural al antibiótico XK-62-2:



30 La base libre del XK-62-2 es muy soluble en agua,
soluble en metanol, ligeramente soluble en etanol o acetona.

1 pero muy soluble en disolventes orgánicos como cloroformo,
 benceno, acetato de etilo, acetato de butilo, éter, metanol,
 éter de petróleo, n-hexano, etc. El sulfato de XK-62-2 es
 5 muy soluble en agua pero insoluble en disolventes orgánicos
 como metanol, acetona, etc.

Los valores Rf del XK-62-2 obtenidos como resul-
 tado de la cromatografía en papel y la cromatografía en capa
 fina utilizando diversos desarrolladores están indicados en
 la siguiente Tabla III.

10

TABLA III

1) Valores Rf del XK-62-2 por cromatografía ascendente en pa-
 pel (28°C)

	<u>Desarrollador</u>	<u>Valor Rf</u>	<u>Periodo de desa rrollo (horas)</u>
15	Cloruro amónico al 20 % (pe- so/volumen)	0,98	3
	n-butanol saturado de agua	0,00	15
	n-butanol/ácido acético/agua (3:1:1)	0,06	15
	Acetato de etilo saturado de agua	0,00	4
20	n-butanol saturado de agua conte- niendo 2 % (peso/volumen) de ácido p-toluensulfónico y 2 % (peso/volumen) de piperidina	0,03	15

2) Valores Rf del XK-62-2 por cromatografía en capa fina de
 gel de sílice (a la temperatura ambiente)

	<u>Desarrollador</u>	<u>Valor Rf</u>	<u>Periodo de desa rrollo (horas)</u>
25	La capa superior de una mezcla de cloroformo, metanol y amoníaco acuoso al 17 % (2:1:1 en volumen)	0,86	3
	Acetato amónico al 10 % en meta- nol (1:1 en volumen)	0,21	3

30

Los valores Rf del XK-62-2 comparados con los de
 antibióticos conocidos por cromatografía en papel utilizando

1 un desarrollador de la capa inferior de cloroformo, metanol y amoniaco acuoso al 17 % (2:1:1) están indicados en la siguiente Tabla IV.

TABLA IV

5 Cromatografía ascendente en papel (a la temperatura ambiente)
Periodo de desarrollo: 12 horas

	<u>Antibióticos</u>	<u>Valor Rf</u>
	Gentamicina A	0,00
	Gentamicina C _{1a}	0,18
10	Gentamicina C ₂	0,38
	Gentamicina C ₁	0,59
	Antibiótico nº 460	0,01
	Sisomicina	0,18
	Neomicina A	0,00
15	Neomicina B	0,02
	Kanamicina A	0,01
	Kanamicina B	0,00
	Paromomicina	0,02
	Complejo nebramicina	0,02
20	Tobramicina	0,00
	XK-62-2	0,49

Basándose en las determinaciones anteriores, se considera que el antibiótico de la invención pertenece al complejo gentamicina. Como ya se ha indicado anteriormente, la producción del antibiótico gentamicina está descrita en la patente estadounidense nº 3.091.572. En esta patente se descubren las propiedades y estructura de la gentamicina así como de otras dos fracciones asociadas identificadas como fracción A y fracción B. Posteriormente se han aislado otras fracciones adicionales. Por ejemplo, en la tesis de

1 Allan S. Kershner, "Separation, Structural and Physical
Studies on The Gentamicin C Complex", Rutgers University,
The State University of New Jersey, 1971, se describe una se-
rie de antibióticos de gentamicina identificados como C₁,
5 C_{2a}, C₂-I, C₂-II, C₂-III y C_{1a}.

El antibiótico de esta invención, aunque estrecha-
mente asociado a los antibióticos conocidos dentro del comple-
jo gentamicina, se ha determinado no obstante que es un anti-
biótico hasta ahora no conocido basándose en las caracterís-
10 ticas antes descritas, especialmente el espectro de absorción
ultravioleta, el espectro de absorción infrarrojo y el espec-
tro de resonancia magnética nuclear. Más específicamente, co-
mo ya se ha dicho, el antibiótico de esta invención es espe-
cialmente semejante a la fracción C_{2a} de la gentamicina. Como
15 se ha dicho, esta fracción no tiene el mismo espectro de re-
sonancia magnética nuclear que el antibiótico de esta inven-
ción. Por lo tanto, el XK-62-2 se considera una nueva sustan-
cia que posee excelentes propiedades antibióticas, como se
ilustrará en las siguientes tablas.

20 Los espectros antibacterianos del XK-62-2 contra
diversos microorganismos están indicados en la siguiente Ta-
bla V.

TABLA V

Espectros antibacterianos del XK-62-2 por el método de dilu-
25 ción en ágar

<u>Microorganismos ensayados</u>	<u>Concentración mí- nima de inhibición (γ/ml)</u>
<u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 10541	1,05
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	< 0,0041
<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8942 (resisten- te a la kanamicina, paromomicina y es-	

1

TABLA V (continuación)

	<u>Microorganismos ensayados</u>	Concentración mínima de inhibición (γ/ml)
	treptomina)	0,065
5	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8950 (resistente a la estreptomina, tetraciclina, penicilina y sulfonamidas)	0,0082
	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8953 (resistente a la estreptomina, kanamicina, paromomicina, tetraciclina, neomicina, kanendomicina y eritromicina)	0,0041
10	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8956 (resistente a la estreptomina, paromomicina, tetraciclina, eritromicina y oleandomicina)	< 0,001
	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8957 (resistente al cloranfenicol, estreptomina, kanendomicina, tetraciclina y paromomicina)	0,0021
15	<u>Bacillus subtilis</u> nº 10707	< 0,004
	<u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	0,016
	<u>Bacillus cereus</u> var. <u>mycoides</u> ATCC 9463	0,0082
	<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	0,0082
	<u>Escherichia coli</u> ATCC 26	0,0082
20	<u>Escherichia coli</u> KY 8302 (resistente al cloranfenicol, estreptomina, kanamicina, paromomicina, tetraciclina y espectinomicina)	0,033
	<u>Escherichia coli</u> KY 8310 (resistente al cloranfenicol, estreptomina, kanamicina, gentamicina, kanendomicina, paromomicina, tetraciclina y espectinomicina)	1,05
25	<u>Escherichia coli</u> KY 8314 (resistente a la estreptomina)	0,0082
	<u>Escherichia coli</u> KY 8315 (resistente a la estreptomina, kanamicina, paromomicina y neomicina)	0,016
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH nº 1	0,53
	<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	0,03
30	<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	0,07
	<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 9992	0,018

1 La actividad in vitro del XK-62-2 contra una va-
riedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas es muy
superior a la de la estreptomina y de la kanamicina y su
5 actividad es comparable a la de la gentamicina. Las activi-
dades comparativas in vitro de estos antibióticos contra di-
versos microorganismos del género Proteus están indicadas
en la siguiente Tabla VI.

10 La actividad antibacteriana del XK-62-2 contra di-
versas variedades clínicamente aisladas de Pseudomonas aeru-
ginosa también se ha comparado con las de la estreptomina,
kanamicina, complejo gentamicina y gentamicina C_{1a} y están
indicadas en la siguiente Tabla VII.

15 Además, la actividad in vivo del XK-62-2 contra
las infecciones bacterianas patógenas se ha determinado en
ratones. Los ratones se infectan con un inoculun de Pseudo-
monas aeruginosa BMH nº 1 o Pseudomonas aeruginosa XY 8510
por inyección intraperitoneal. Después se tratan con diver-
sas dosis del antibiótico experimental por inyección subcu-
tánea. El efecto del XK-62-2 de protección contra las infec-
20 ciones bacterianas está indicado en la siguiente Tabla VIII,
en la que se utilizaron 10 ratones en cada ensayo.

25

30

1

TABLA VI

Concentración mínima de inhibición (γ/ml: por el método de dilución de ágar)

	<u>Microorganismos</u>	<u>XK-62-2</u>	<u>Complejo gentamicina</u>	<u>Estreptomicina</u>	<u>kanamicina</u>
5	<u>Proteus vulgaris</u> KY 4296	0,021	0,021	-	-
	<u>Proteus vulgaris</u> KY 4297	0,021	0,021	-	-
	<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	0,04	0,04	>40	0,34
10	<u>Proteus vulgaris</u> Abbott JJ	0,021	0,021	>40	0,16
	<u>Proteus mirabilis</u> Finland 9	0,04	0,04	>40	0,04
	<u>Proteus mirabilis</u> nº 825	0,021	0,021	>40	0,04
	<u>Proteus mirabilis</u> nº 39	0,021	0,04	>40	0,33
15	<u>Proteus morgani</u> Jenkins	0,04	0,04	>40	0,16
	<u>Proteus rettgeri</u> Booth	0,021	0,021	>40	0,08
	<u>Proteus rettgeri</u> Hambrook	0,021	<0,01	>40	0,08

TABLA VII

Concentración mínima de inhibición (γ/ml: por el método de dilución de ágar)

	<u>Variedades de Pseudomonas aeruginosa</u>	<u>XK-62-2</u>	<u>Complejo gentamicina</u>	<u>Gentamicina C_{1a}</u>	<u>Estreptomicina</u>	<u>kanamicina</u>
	KY 4276	0,33	0,33	0,33	2,6	1,63
	KY 8510	0,33	1,3	2,6	0,65	13
25	KY 8511	>42	42	42	>2500	13
	KY 8512	0,33	0,65	0,33	42	3,3
	KY 8514	0,55	1,3	0,33	156	208
	KY 8515	>42	62	>42	624	416
	KY 8516	0,33	1,3	5,2	0,65	26
	KY 8520	0,33	0,65	0,33	5,2	104
30	KY 8562	>42	62	>42	156	167

1

TABLA VIII

Dosis (ng/ratón)	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH n° 1		<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8510		
	<u>XK-62-2</u>	<u>Complejo gen- tamicina</u>	<u>XK-62-2</u>	<u>Comple- jo gen- tamicina</u>	<u>Gentami- cina</u>
5	Supervivencia de ratones (%)				
2	100	100	100	90	20
1	90	100	80	40	10
0,5	50	70	50	30	0
0,25	10	20	30	10	0
10	0,125	0	0	0	0

10

Como evidencia todo lo anterior, el XK-62-2 presenta una actividad antibacteriana muy intensa contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. El XK-62-2 también presenta una intensa actividad antibacteriana contra Staphylococcus aureus y Escherichia coli que son resistentes a diversos antibióticos conocidos y es especialmente eficaz sobre los microorganismos del género Proteus y Pseudomonas sobre los que hasta ahora se conocen pocos antibióticos eficaces.

15

20

En las tablas anteriores se observa que el XK-62-2 presenta una excelente actividad antibacteriana y un excelente efecto terapéutico contra ciertas variedades (aislados clínicos) de Pseudomonas aeruginosa en comparación los del complejo gentamicina o gentamicina C_{1a}, que es uno de los componentes del complejo gentamicina. Más específicamente, el XK-62-2 presenta una actividad antibacteriana contra Pseudomonas aeruginosa KY 8510 y KY 8516 mucho mayor que el complejo gentamicina o que la gentamicina C_{1a}. Como resultado de estudios enzimológicos, se ha encontrado que las variedades KY 8510 y 8516 contienen un sistema enzimático específico que

25

30

1 inactiva a la gentamicina C_{1a} o a la kanamicina por acetilación del grupo 6'-NH₂ de la purporosamina de la gentamicina C_{1a} o del grupo 6'-NH₂ de la kanamicina. Esta es la razón fundamental por la cual las variedades KY 8510 y 8516 son resis-

5 tentes especialmente a la gentamicina C_{1a}. Sin embargo, estas dos variedades son sensibles al XK-62-2. Se considera que ello es debido a que el XK-62-2 no es acetilado por este enzima desactivante ya que el grupo 6'-NH₂ del XK-62-2 está metilado. Así, en comparación con la gentamicina C_{1a} o con el complejo

10 gentamicina que contiene gentamicina C_{1a}, el XK-62-2 es especialmente efectivo en su actividad antibacteriana contra Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae que presentan este mecanismo de resistencia acetilante.

15 Otros antibióticos, a saber el complejo gentamicina [M.J. Weinstein y colaboradores: Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1963) I y D.J. Cooper y colaboradores: J. Infect. Dis. 119, 342 (1969)], el antibiótico nº 460 (solicitud de patente japonesa 16153/71) y la sisomicina [M.J. Weinstein y colaboradores: J. Antibiotics 23, 551, 555, 559 (1970)] son anti-

20 bióticos básicos solubles en agua, con un amplio espectro antimicrobiano que son producidos por microorganismos del género Micromonospora. Sin embargo, como resulta claramente evidente de lo anterior, el XK-62-2 se distingue fácilmente de cualquier

25 ra de las gentamicinas A, C_{1a}, C₂ y C₁, todos ellos componentes del complejo gentamicina, del antibiótico nº 460 y de la sisomicina en los valores R_f obtenidos por cromatografía en papel. Los antibióticos aminoglicosidos básicos, solubles en agua, por ejemplo la neomicina A, neomicina B, kanamicina A, kanamicina B, paromomicina, complejo nebramicina y tobramicina,

30 se considera que poseen propiedades similares a las del

1 XK-62-2. Sin embargo, también es evidente que el XK-63-2 es completamente distinto de estos antibióticos por sus valores Rf.

5 La práctica de ciertas realizaciones específicas de esta invención es ilustrada mediante los siguientes ejemplos representativos.

EJEMPLO 1

A. Cultivo de MK-65:

10 En este ejemplo se utiliza Micromonospora sagamiensis MK-65 ATCC 21826 (FERM-P nº 1530) como variedad de siembra. Se inoculan 4 ml de la variedad de siembra en 30 ml de un primer medio de siembra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. El primer medio de siembra tiene la siguiente composición:

15	Dextrina	1 %
	Glucosa	1 %
	Peptona	0,5 %
	Extracto de levadura	0,5 %
	Carbonato cálcico	0,1 %
20	(pH: 7,2 antes de la esterilización).	

25 El cultivo se realiza sacudiendo a 30°C durante 5 días. Después se inoculan 30 ml del cultivo de siembra en 300 ml de un segundo medio de siembra, de la misma composición que el primer medio, en un matraz Erlenmeyer de 2 litros provisto de tabiques. El segundo cultivo de siembra se lleva a cabo sacudiendo a 30°C durante 2 días. Después se inoculan 1,5 l del segundo cultivo de siembra (correspondiente al contenido de 5 matraces) en 15 l de un tercer medio de siembra de la misma composición que los anteriores, en un fermentador vibratorio de vidrio de 30 l. El cultivo en el fermentador vi-

30

1 bratorio se efectúa con aireación (15 l/minuto) y agitación
(350 rpm) a 30°C durante 2 días. Después se inoculan 15 l del
tercer cultivo de siembra en 60 l de un cuarto medio de siem-
bra de la misma composición que los anteriores, en un fermentador de 300 l. El cultivo en este fermentador se lleva a cabo con una aireación (60 l/minuto) y agitación (150 rpm) a 30°C durante 2 días. Finalmente se inoculan 60 l del cuarto cultivo de siembra en 600 l de un medio de fermentación con la siguiente composición, en un fermentador de 1000 l:

10	Dextrina	5 %
	Harina de soja	4 %
	CaCO ₃	0,7 %

(pH: 7,2 antes de la esterilización).

15 El cultivo en el fermentador se lleva a cabo con
aireación (600 l/minuto) y agitación (150 rpm) a 35°C durante
5 días.

B. Aislamiento del antibiótico crudo:

Una vez completada la fermentación, el líquido de cultivo se ajusta a pH 2,0 con ácido sulfúrico 12 N y se agita durante 30 minutos. Después se añaden unos 10 kg de un auxiliar de filtración, Radiolite nº 600 (producto de Showa Kagaku Kogyo Co., Ltd., Japón) y las células microbianas se separan por filtración. El filtrado se ajusta a pH 8 con hidróxido sódico 6 N y se pasa por una columna rellena con unos 50 l de resina cambiadora de catión, Amberlite IRC-50 (forma amónica). La sustancia activa se absorbe sobre la resina y se despreja el eluato. Después de lavar la resina con agua, se eluye la sustancia activa con amoníaco acuoso 1 N. La actividad del eluato así obtenido se determina frente a Bacillus subtilis nº 10707 por un método de disco de papel utilizando

1 una placa de ágar.

5 Las fracciones activas se combinan y concentran a vacío hasta unos 5 l. Después el concentrado se ajusta a pH 8,0 con ácido sulfúrico 6 N y se pasa por una columna rellena con 1 l de una resina cambiadora de anión, Dowex 1x2 (forma OH⁻). La columna se lava con unos 5 l de agua y la sustancia activa se concentra hasta 1/15 de su volumen. El concentrado se ajusta a pH 10,5 con hidróxido sódico 6 N y se añaden cinco volúmenes de acetona. El precipitado resultante se separa por filtración y el filtrado se concentra hasta 500 ml. El concentrado se ajusta a pH 4,5 con ácido sulfúrico 6 N y se añaden 2,5 l de metanol. Después de enfriar, se obtiene un precipitado blanco. El precipitado se separa por filtración y se lava con metanol. Después de secar a vacío, se obtienen unos 300 g de un polvo blanco. Este último es una mezcla del sulfato de gentamicina C_{1a} y sulfato de XK-62-2 y presenta una actividad de 620 unidades/mg (la actividad de 1 mg de producto puro corresponde a 1000 unidades).

15 C. Aislamiento y purificación de XK-62-2:

20 Sobre la parte superior de una columna de 5 cm de diámetro por 150 cm, rellena con unos 3 kg de gel de sílice previamente suspendidos en un disolvente formado por cloroformo, isopropanol y amoníaco acuoso (2:1:1 en volumen), se colocan 100 g del polvo blanco obtenido en la etapa B anterior formando una delgada capa uniforme. Después se lleva a cabo la elución con el mismo disolvente a un caudal de unos 250 ml/hora. El eluato se separa en porciones de 100 ml. La fracción activa se somete a cromatografía en papel para examinar los componentes eluidos. El XK-62-2 se eluye en las fracciones
25
30 núms. 53-75 y la gentamicina C_{1a} se eluye en las fracciones

1 núms. 85-120. Se combinan las fracciones núms. 53-75 y se con-
centran a presión reducida para separar suficientemente el di-
solvente. Después el concentrado se disuelve en una pequeña
5 cantidad de agua. Después de liofilizar la solución, se obtie-
nen alrededor de 38 g de un preparado purificado de XK-62-2
(base libre). El preparado tiene una actividad de 950 unida-
des/mg. Análogamente se combinan las fracciones núms. 85-120
y se concentran a presión reducida para separar suficiente-
mente el disolvente. Después el concentrado se disuelve en
10 una pequeña cantidad de agua. Una vez liofilizada la solución,
se obtienen alrededor de 50 g de un preparado purificado de
gentamicina C_{1a} (base libre). La actividad del preparado es
alrededor de 980 unidades/mg.

EJEMPLO 2

15 En este ejemplo se utiliza Micromonospora saga-
miensis var. flava Mm 628 ATCC 21827 (FERM-P- n^o 1531) como
variedad de siembra. El cultivo de siembra se realiza de la
misma forma descrita en el Ejemplo 1, utilizando el mismo me-
dio de siembra. Se inoculan 60 l del cuarto cultivo de siem-
20 bra en 600 l de un medio de fermentación en un fermentador
de 1000 l. La composición del medio de fermentación es la si-
guiente:

	Almidón soluble	4 %
	Licor de infusión de maíz	1 %
25	Harina de soja	2 %
	K ₂ HPO ₄	0,05 %
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 %
	KCl	0,03 %
	CoCl ₂ ·2H ₂ O	0,005 %
30	CaCO ₃	0,1 %

1 La fermentación se lleva a cabo aireando con 600 l/
minuto y agitando a 150 rpm, a 30°C, durante 96 horas. Una
vez completada la fermentación, el producto crudo se separa
5 del líquido de cultivo en la forma descrita en el Ejemplo 1
para obtener 400 g de un polvo blanco. Como resultado de la
cromatografía en papel, se encuentra que el polvo contiene
gentamicina C₁, C₂ y C_{1a} además de XK-62-2.

10 Los 400 g del polvo blanco se colocan entonces so-
bre la parte superior de una columna de vidrio cilíndrica, re-
llena uniformemente con unos 8 kg de gel de sílice, que se
han suspendido previamente en un disolvente formado por clo-
roformo, isopropanol y amoníaco acuoso al 17 % (2:1:1 en vo-
lumen). Después de colocar el polvo sobre la parte superior
15 de la columna, se realiza la elución con el mismo sistema di-
solvente a un caudal de unos 500 ml/hora. El eluato se separa
en fracciones de 500 ml. Cada una de las fracciones se some-
te a cromatografía de papel. Como resultado de ello se encuen-
tra que cada uno de los componentes es eluido en el siguiente
orden: gentamicina C₁, XK-62-2, gentamicina C₂ y gentamicina
20 C_{1a}. Las fracciones que contienen el mismo componente se com-
binan y concentran. El concentrado se disuelve en agua y se
liofiliza y se aíslan los siguientes componentes en forma de
base libre.

25	<u>Componente</u>	<u>Actividad unidades/mg</u>	<u>Rendimiento, (g)</u>
	gentamicina C ₁	880	150
	XK-62-2	932	60
	Gentamicina C ₂	925	113
	Gentamicina C _{1a}	940	52

30

EJEMPLO 3

1 En este ejemplo se utiliza Micromonospora saga-
5 miensis var. nonreducans MK-62, ATCC 21803 (FERM-P nº 1477)
como variedad de siembra. Se inoculan 4 ml de la variedad de
siembra en 30 ml de un primer medio de siembra contenidos en
un Erlenmeyer de 250 ml. El medio de siembra está constituido
por:

Dextrina	1 %
Glucosa	1 %
Peptona	0,5 %
Extracto de levadura	0,5 %
Carbonato cálcico	0,1 %

(pH: 7,2 antes de la esterilización).

15 El cultivo se realiza sacudiendo a 30°C durante 5
días. Después se inoculan 30 ml del cultivo de siembra en
300 ml de un segundo medio de siembra, en la misma composi-
ción indicada anteriormente, en un Erlenmeyer de 2 litros
provisto de tabiques. El segundo cultivo de siembra se reali-
za sacudiendo a 30°C durante 2 días. Después se inoculan
20 1,5 litros del segundo cultivo de siembra (correspondiente
al contenido de 5 matraces) en 15 litros de un tercer medio
de siembra, de la composición antes indicada, en un fermenta-
dor vibratorio de vidrio, de 30 litros.

25 El cultivo del fermentador vibratorio se lleva a
cabo con aireación (15 l/minuto) y agitación (300 rpm) a 30°C
durante 2 días. Después se inoculan 15 l del tercer cultivo
de siembra en 60 l de un cuarto medio de siembra de la misma
composición indicada, en un fermentador de 300 l. El cultivo
30 en el fermentador se lleva a cabo con una aireación (70 l/mi-
nuto) y agitación (150 rpm) a 30°C durante 2 días. Finalmente

1 se inoculan 60 l del cuarto cultivo de siembra en 600 l de un medio de fermentación de la siguiente composición, en un fermentador de 1000 l:

5 Dextrina 5 %
Harina de soja 3,5 %
CaCO₃ 0,7 %
(pH: 7,2 antes de la esterilización).

El cultivo del fermentador se realiza con aireación (500 l/minuto) y agitación (150 rpm) a 30°C durante 5 días.

10 Una vez completada la fermentación, el líquido de cultivo se ajusta a pH 2,0 con ácido sulfúrico 12 N y se agita durante 30 minutos. Después se añaden unos 10 kg de Radiolite nº 600 y las células microbianas se separan por filtración. El filtrado se ajusta a pH 8,0 con hidróxido sódico 6 N y se pasa por una columna rellena con unos 50 l de una resina cambiadora de catión, Amberlite IRC-50 (forma amónica). El eluato se desprecia. Después de lavar la resina con agua, la sustancia activa se eluye con amoníaco acuoso 1 N. La actividad del eluato así obtenido se determina frente a Bacillus subtilis nº 10707 por un método en disco de papel utilizando una placa de ágar.

15 Las fracciones activas se combinan y concentran a vacío hasta unos 5 l. El concentrado se ajusta a pH 8,0 con ácido sulfúrico 6 N y se pasa por una columna rellena con 1 l de una resina cambiadora de anión, Dowex 1 x 2 (forma OH⁻) y después se lava con unos 5 l de agua para separar las impurezas. La fracción activa se concentra hasta 1/15 de su volumen. El concentrado se ajusta después a un pH de 10,5 con hidróxido sódico 6 N y se añaden 5 volúmenes de acetona. El precipitado resultante se separa por filtración y la capa acetónica se

20

25

30

1 concentra a 500 ml. El concentrado se ajusta a pH 4,5 con áci
do sulfúrico 6 N y se agregan 2,5 l de metanol. Después de
enfriar, se obtiene un precipitado blanco. El precipitado se
5 separa por filtración y se lava con metanol. Después de se-
car a vacío, se obtienen 16-20 g de un polvo blanco. Este
último es una mezcla del sulfato de gentamicina C_{1a} y de
XK-62-2 y presenta una actividad de 550 unidades/mg (la acti
vidad de 1 mg de producto puro corresponde a 1000 unidades).

10 Sobre la parte superior de una columna de 25 mm
de diámetro por 50 cm de longitud, rellena con unos 300 ml
de gel de sílice que se ha suspendido previamente en una
mezcla disolvente formada por cloroformo, isopropanol y amo-
niaco acuoso (2:1:1 en volumen), se coloca una capa uniforme
y delgada formada por 5 g del polvo blanco. Después se lle-
15 va a cabo la elución con el mismo disolvente a un caudal de
unos 30 ml/h. El eluato se separa en porciones de 10 ml. La
fracción activa se somete a cromatografía de papel para exa-
minar los componentes eluidos. El XK-62-2 se eluye en las
fracciones 53-75 y la gentamicina C_{1a} se eluye en las frac-
20 ciones 85-120. Se combinan las fracciones 53-75 y se concen-
tran a presión reducida para separar suficientemente el di-
solvente. El concentrado se disuelve en una pequeña cantidad
de agua. Después de liofilizar la solución, se obtienen alre-
dedor de 900 mg de un preparado purificado de XK-62-2 (base
25 libre). El preparado tiene una actividad de unas 950 unida-
des/mg. Análogamente, se combinan las fracciones 85-120 y se
concentran a presión reducida para separar suficientemente
el disolvente. El concentrado se disuelve en una pequeña can-
30 tidad de agua. Después de liofilizar la solución, se obtie-
nen alrededor de 1,8 g de un preparado purificado de gentami

1 cina C_{1a} (base libre). La actividad del preparado es alrededor de 980 unidades/mg.

EJEMPLO 4

5 En este ejemplo se utiliza de nuevo Micromonospora sagamiensis var. nonreducans MK-62 (ATCC 21803) como variedad de siembra. La composición del medio de siembra es la siguiente:

Almidón soluble	2 %
Amina NZ tipo A	0,5 %
10 Extracto de levadura	0,5 %
Carbonato cálcico	0,1 %

15 Se inoculan 4 ml del cultivo de siembra en 300 ml del medio de siembra en un Erlenmeyer de 2 l. El primer cultivo de siembra se realiza sacudiendo a 30°C durante 4 días. Después el contenido de los tres matraces del primer cultivo de siembra se inocula en 15 l de un medio de siembra fresco en un fermentador vibratorio de 30 l. El segundo cultivo de siembra se lleva a cabo con aireación y agitación a 30°C durante 2 días. Después se transfieren 150 l del tercer cultivo de siembra a un tanque de 3000 l que contiene 150 l de un medio de fermentación con la siguiente composición:

Almidón soluble	4 %
Licor de infusión de maíz	1 %
Harina de soja	2 %
25 K ₂ HPO ₄	0,05 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 %
KCl	0,03 %
CoCl ₂ ·2H ₂ O	0,005 %
CaCO ₃	0,1 %

30 La fermentación se efectúa aireando y agitando a

1 30°C durante 4 días. La producción de sustancia activa alcanza un máximo al cabo de 4 días de fermentación y la actividad de la sustancia no es reducida durante algún tiempo.

5 Una vez completada la fermentación, el líquido de cultivo se ajusta a un pH de 2,0 con ácido oxálico y se agita durante una hora. De esta forma, la mayor parte de la sustancia activa contenida en las células microbianas es extraída al líquido. Después se añaden 20 kg de un auxiliar de filtración, Celite 545 y las células microbianas y el oxalato cálcico se separan por filtración. El filtrado se ajusta a 10 pH 6,8 con hidróxido sódico 6 N y se pasa por una columna rellena con unos 100 l de una resina cambiadora de catión, Amberlite IRC-50 (forma sódica). La columna se lava con agua. El efluente y las aguas de lavado contienen las impurezas y 15 las sustancias que no son absorbidas sobre la resina y que presentan actividad solamente sobre los microorganismos Gram-positivos.

20 La elución se realiza con unos 300 l de ácido sulfúrico 2 N y los componentes activos se recuperan en el eluato en fracciones. Se combinan las fracciones y se ajustan a pH 7,5 con hidróxido sódico 2 N. La solución resultante se concentra a presión reducida hasta 20 l y el concentrado se ajusta a pH 10,5 con hidróxido sódico 2 N. Se añaden cinco volúmenes de acetona mientras se agita, con lo que se forma un 25 precipitado que después se separa por filtración y se lava con acetona. Se combinan el filtrado y las aguas de lavado y se concentran bajo presión hasta 1 l. El concentrado se ajusta a pH 4,5 con ácido sulfúrico 6 N. Después se añaden 5 l de metanol con agitación y la mezcla resultante se deja en 30 reposo en una cámara fría. Se forma así un precipitado blanco

1 que se separa por filtración y se lava con metanol. Al secar
el precipitado a vacío se obtienen alrededor de 65 g de anti-
biótico crudo. El polvo crudo es una mezcla del sulfato de
gentamicina C_{1a} y del de XK-62-2 y tiene una actividad de 450
5 unidades/mg.

Después se disuelven 60 g del polvo crudo así obte-
nido en 10 l de agua. La solución se ajusta a pH 8,0 con hi-
dróxido sódico 2 N y se pasa por una columna rellena con 3 l
de una resina cambiadora de anión, Amberlite IRA-400 (forma
10 OH⁻). La columna se lava con 10 l de agua y el eluato y las
aguas de lavado se combinan y concentran hasta 1 l. El concen-
trado se ajusta a pH 4,5 con ácido sulfúrico 6 N y se añaden
10 l de metanol. De esta forma se obtienen unos 50 g del sul-
fato purificado de un antibiótico.

15 Alrededor de 50 g del antibiótico purificado se co-
locan sobre la parte superior de una columna de 4 cm de diá-
metro por 100 cm de longitud, rellena con unos 2,8 l de celu-
losa en polvo. La elución se realiza gradualmente con la ca-
pa inferior de una mezcla disolvente formada por cloroformo,
20 metanol y amoníaco al 17 % (2:1:1). La velocidad de elución
es comprobada para que no pase de porciones de 100 ml. El
elulato se separa en porciones de 20 ml y el XK-62-2 y la gen-
tamicina C_{1a} se eluyen independientemente en las fracciones
62-86 y 95-130, respectivamente. Se combinan las fracciones
25 de cada uno de los componentes y se concentran a presión redu-
cida para separar el disolvente y después el concentrado se
disuelve en una pequeña cantidad de agua. La solución resul-
tante se ajusta a pH 4,5 con ácido sulfúrico 2 N. Después de
liofilizar, se obtienen 8,7 g del sulfato de XK-62-2 (792 uni-
30 dades/mg) y 1,8 g del de gentamicina C_{1a} (787 unidades/mg),

1 ambos en forma de un polvo blanco.

5 Para preparar la base libre, se disuelven 5 g del sulfato de XK-62-2 en 500 ml. de agua y se pasa a través de una columna recubierta con 70 ml. de una resina cambiadora de anión, Dowex 1 x 2 (forma OH⁻). Después de lavar la columna con 500 ml de agua, el eluato que presenta actividad se concentra bajo presión reducida hasta 100 ml. Después de liofilizar el concentrado, se obtienen 3,3 g de una base libre de XK-62-2 (990 unidades/mg).

10 EJEMPLO 5. El cultivo de MK-62-NG-164 se realiza de la misma forma que en el Ejemplo 3, para obtener 956 (750 unidades/mg), de una mezcla de C_{1a} y XK-62-2. La mezcla se trata de la misma forma que en la etapa C del ejemplo 1 para proporcionar 49 g de XK-62-2 (975 unidades/mg) y 0,95 g de C_{1a} (980 unidades/mg).

15 EJEMPLO 6. En este ejemplo se utiliza Micromonospora purpurea NRRL 2953 como variedad de siembra. El cultivo se realiza en la forma indicada en el Ejemplo 2. De esta manera se obtienen 60 g de un polvo blanco como se describe en la etapa B del Ejemplo 1. Como resultado de la cromatografía en papel, se determina que este polvo contiene cada uno de los siguientes componentes: XK-62-2, gentamicina C₁, gentamicina C₂ y gentamicina C_{1a}. Cada uno de estos componentes es aislado a partir del polvo en forma de base libre, de la manera descrita en el Ejemplo 2. Los resultados son los siguientes:

30



	<u>Componente</u>	<u>Actividad (unidades/mg)</u>	<u>Rendimiento (g)</u>
1	gentamicina C ₁	821	21
	XK-62-2	925	2
	gentamicina C ₂	880	15
5	gentamicina C _{1a}	850	7

EJEMPLO 7

En este ejemplo se utilizan como variedades de siembra Micromonospora echinospora ATCC 15837, Micromonospora echinospora var. ferruginea ATCC 15836, NRRL 2995 y Micromonospora echinospora var. pallida ATCC 15838, NRRL 2996. El cultivo se realiza en la forma descrita en el Ejemplo 2 para obtener un polvo blanco que comprende una mezcla de los componentes de cada uno de los líquidos de cultivo en la forma descrita en la etapa B del Ejemplo 1. Después cada uno de estos componentes es aislado en forma de base libre de la manera descrita en el Ejemplo 2.

La actividad y el rendimiento de cada una de las fracciones así aisladas son los siguientes:

	<u>Micromonospora echinospora ATCC 15837</u>		<u>Micromonospora echinospora var. ferruginea NRRL 2995</u>		<u>Micromonospora echinospora var. pallida NRRL 2996</u>		
	<u>actividad (unidades/mg)</u>	<u>rendimiento (g)</u>	<u>actividad (unidades/mg)</u>	<u>rendimiento (g)</u>	<u>actividad (unidades/mg)</u>	<u>rendimiento (g)</u>	
20	Gentamicina C ₁	906	15	830	13	940	18
25	XK-62-2	898	3	912	1,5	925	2,5
	Gentamicina C ₂	845	12	853	8	859	7,5
	Gentamicina C _{1a}	880	9	920	5,8	890	11

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

REIVINDICACIONES

1

1.- Un procedimiento para la producción de un
antibiótico perteneciente al complejo gentamicina C que con
siste en cultivar un microorganismo perteneciente a la espe
cie Micromonospora sagamiensis en un medio nutritivo; acumu
lar el antibiótico en dicho medio; y después aislar del mis
mo el complejo de gentamicina C.

5

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado porque dicho microorganismo está seleccionado
entre el grupo formado por Micromonospora sagamiensis ATCC
21826, Micromonospora sagamiensis var. flava ATCC 21827 y
Micromonospora sagamiensis var. nonreducans ATCC 21803.

10

3.- Un procedimiento según la reivindicación 2,
caracterizado porque dicha etapa de aislamiento comprende
aislar de dicho líquido de cultivo por lo menos uno de los
antibióticos del grupo formado por gentamicina C₁, gentami
cina C₂ y gentamicina C_{1a}.

15

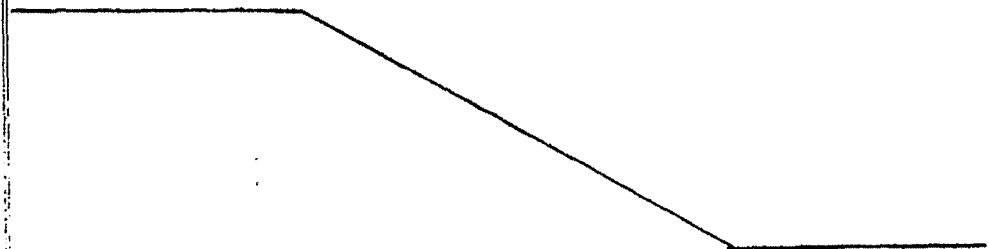
4.- Un procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado porque dicha etapa de cultivo se lleva a cabo
a una temperatura entre 25°C y 55°C y a un pH aproximadamen
te neutro.

20

5.- Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita
por: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN ANTIBIOTICO
PERTENECIENTE AL COMPLEJO GENTAMICINA C.

25

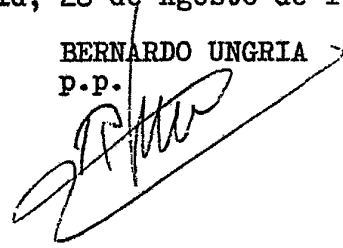
30



1 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente Memoria descriptiva que consta de treinta y
siete páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

5 Madrid, 28 de Agosto de 1.975

BERNARDO UNGRIA
P.P.



10

15

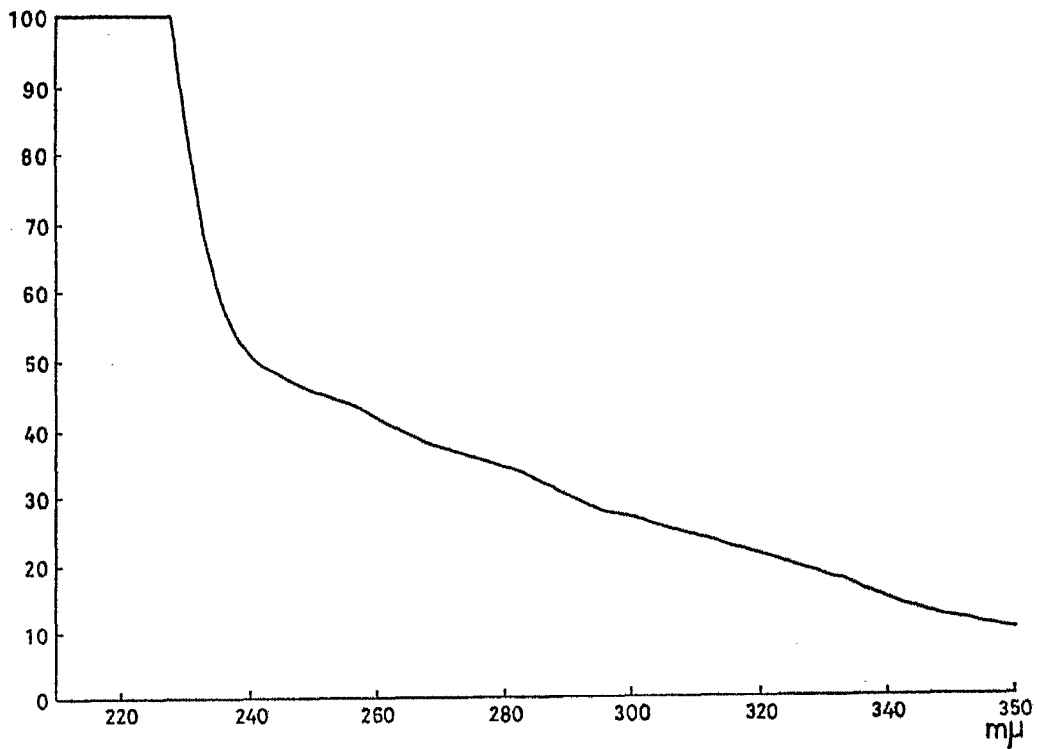
20

25

30



FIG-1



ESCALA VARIABLE

Madrid, 28 de Agosto de 1975

BERNARDO UNGRIA

P. D.

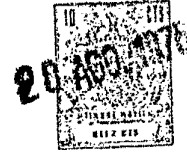
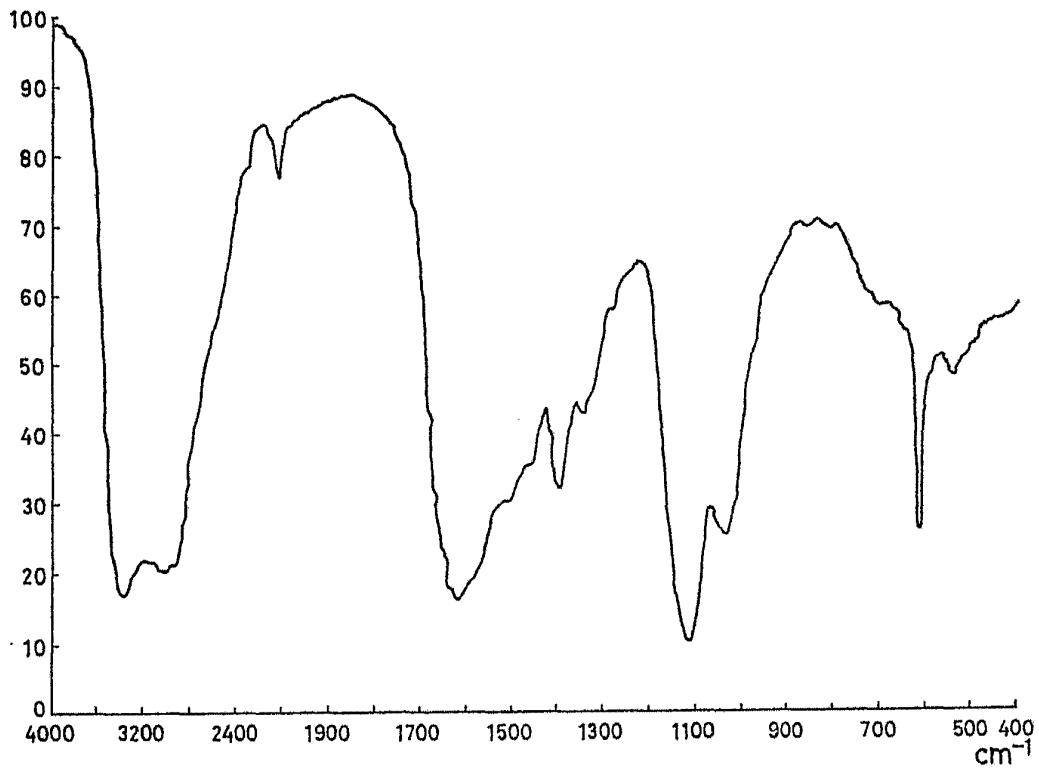


FIG-2



ESCALA VARIABLE

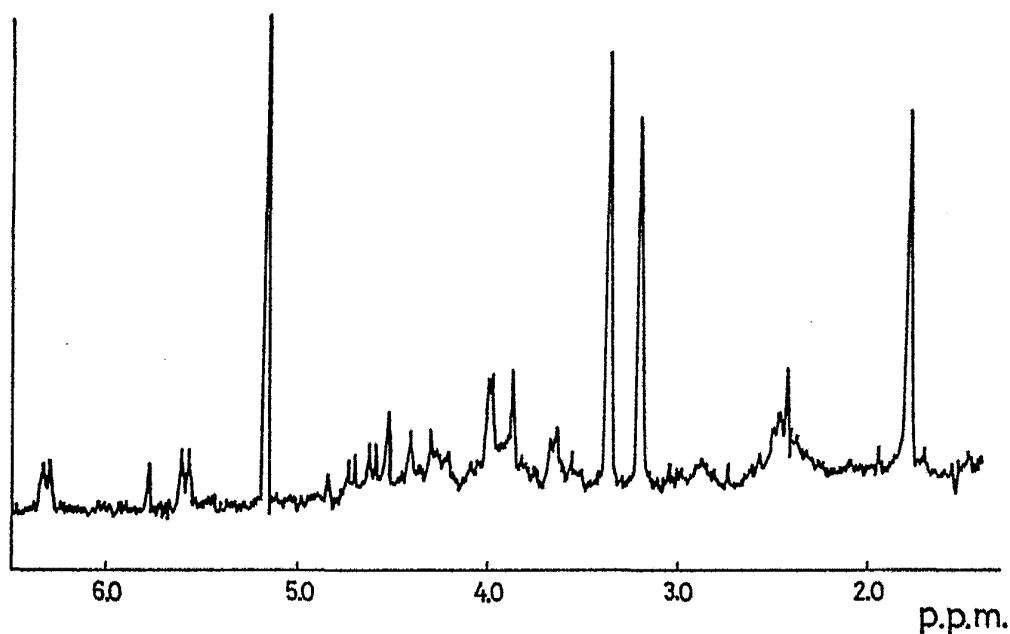
Madrid, 28 de Agosto de 1975

BERNARDO UNGRIA

P. R.



FIG-3



ESCALA VARIABLE

Madrid, 28 de Agosto de 1975

BERNARDO UNGRIA

p. p.