



ESPAÑA

442.920

PATENTE DE INVENCION

10 ES	11	NUMERO	19 A1
	21	442.920	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		24.11.1975	

20 PRIORIDADES:	22 FECHA	23 PAIS
31 NUMERO		
526.992	25.11.1974	Estados Unidos

47 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D//A61K	

54 TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO TIENAMICINA.

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

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New Jersey 07065 P.O.Box 2000 Estados Unidos.

72 INVENTOR (ES)

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1

## RESUMEN DE LA INVENCION

5

El antibiótico tienamicina es activo contra bacterias gram-positivas y gram-negativas. El antibiótico es producido cultivando una especie recién encontrada y hasta ahora no descrita de Streptomyces sobre medios de fermentación adecuados.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

15

20

El descubrimiento de las notables propiedades antibióticas de la penicilina estimuló un gran interés en este campo que ha dado lugar al hallazgo de otras muchas valiosas sustancias antibióticas tales como: otras penicilinas, estreptomicina, bacitracina, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicinas y similares. En general, la actividad antibacteriana de cada uno de estos antibióticos no incluye a ciertas bacterias patógenas clínicamente importantes. Por ejemplo, algunos son principalmente activos solamente contra los tipos gram-positivos de bacterias. La resistencia adquirida en el transcurso de la amplia aplicación de los antibióticos existentes en el tratamiento de las infecciones bacterianas ha planteado un grave problema de resistencia.

25

Por consiguiente, las deficiencias de los antibióticos conocidos han estimulado nuevas investigaciones para encontrar otros antibióticos que sean activos contra una gama más amplia de agentes patógenos así como contra

1 las cepas resistentes de microorganismos particulares.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a un nuevo agente anti-  
biótico. Más especialmente, se refiere a una nueva sus-  
tancia antibiótica, aquí denominada tienamicina. La in-  
vención comprende el antibiótico en formas diluídas, co-  
mo concentrados crudos y en formas puras.

10 Un objeto de esta invención es proporcionar un nue-  
vo y útil antibiótico que es muy eficaz para inhibir el  
crecimiento de diversos microorganismos gram-negativos y  
gram-positivos. Otro objeto es proporcionar un procedimien-  
to para la preparación de esta nueva sustancia antibiótica  
por fermentación de medios nutrientes con un microorganis-  
mo hasta ahora no descrito. Otros objetos resultarán evi-  
dentes en la descripción detallada de esta invención dada  
a continuación.

15 La nueva sustancia antibiótica de esta invención  
es producida cultivando bajo condiciones controladas el  
microorganismo Streptomyces cattleya anteriormente no des-  
crito.

20 Basándose en extensos estudios taxonómicos, el  
Streptomyces cattleya, aislado de una muestra de tierra,  
fue identificado como un actinomicetes hasta ahora no  
descrito y ha sido designado con la denominación MA-4297  
25 en la colección de cultivos de Merck & Co., Inc., Rahway,

1 N.J. Un cultivo del mismo ha sido colocado en depósito  
permanente con la colección de cultivos de los Northern  
Regional Research Laboratories, Northern Utilization Re-  
5 search and Development Division, Agricultural Research  
Service, Departamento de Agricultura de Estados Unidos,  
Peoria, Ill., y se le ha asignado la accesión nº NRRL  
8057.

Las claves de clasificación del género Streptomyces  
y las descripciones de cultivo de la especie Streptomyces  
10 encontradas en la obra de Bergey, Manual of Determinative  
Bacteriology (7ª Edición, 1957) y en The Actinomycetes,  
Vol. II (1961) por S.A. Waksman y en "Cooperative  
Descriptions of Type Cultures of Streptomyces" por E.B.  
Shirling y D. Gottlieb, International Journal of Systematic  
15 Bacteriology, 18, 69-189 (1968), 18, 279-392 (1968), 19,  
391-512 (1969) y 22, 265-394 (1972) fueron investigadas  
para tratar de encontrar una especie de Streptomyces con  
características morfológicas y de cultivo similares a  
las del MA-4297. En las mencionadas referencias clásicas,  
20 no se describe ninguna especie de Streptomyces que posea  
la pigmentación de orquídea del micelio aéreo, las carac-  
terísticas morfológicas y la ausencia de pigmento difusi-  
ble que juntas constituyen las características distinti-  
vas del MA-4297. Estas consideraciones hacen justificada  
25 y necesaria la asignación de una nueva especie de

1        Streptomyces.

Las características morfológicas y de cultivo del Streptomyces cattleya están indicadas en la siguiente tabla.

5        Morfología

Los esporoforos son espirales compactas que se producen como ramas laterales y terminales sobre el micelio aéreo. Las esporas son de forma entre elíptica y cilíndrica, con un tamaño de  $0,9 \mu \times 1,2 \mu$ , que aparecen en cadenas de más de 10.

10       Cultivo

Agar pasta de tomate-harina de avena

Crecimiento vegetativo - Reverso de color tostado, plano, extendido;

15       Micelio aéreo - Orquídea (10 gc) mezclado con blanco;

Pigmento soluble - Ninguno.

Agar Czapek Dox (agar nitrato de sacarosa)

20       Crecimiento vegetativo - Incoloro, plano, extendido;  
Micelio aéreo - Escaso, blanco rosado;

Pigmento soluble - Ninguno.

Agar albúmina de huevo

25       Crecimiento vegetativo - Color tostado con un tinte orquídea grisáceo, plano, extendido;

Micelio aéreo - Orquídea (10 gc) mezclado con to-

- 1           nalidades más claras de orquídea y algo de blanco;  
            Pigmento soluble - Ninguno.  
            Agar glicerol-asparagina  
            Crecimiento vegetativo - Reverso de color tostado
- 5           con tinte rosa grisáceo, plano, extendido;  
            Micelio aéreo - Orquídea (10 gc) mezclado con al-  
            go de blanco;  
            Pigmento soluble - Ninguno.  
            Agar extracto de levadura-glucosa + sales
- 10           Crecimiento vegetativo - Color tostado con tinte  
            rosa grisáceo;  
            Micelio aéreo - Orquídea (10 gc) mezclado con blan  
            co rosado;  
            Pigmento soluble - Ninguno.
- 15           Agar extracto de levadura-extracto de malta  
            Crecimiento vegetativo - Color tostado;  
            Micelio aéreo - Orquídea (10 gc) mezclado con blan  
            co rosado;  
            Pigmento soluble - Ninguno.
- 20           Agar peptona-hierro-extracto de levadura  
            Crecimiento vegetativo - Color tostado;  
            Micelio aéreo - Ninguno;  
            Pigmento soluble - Ligero pardeamiento del medio;  
            Melanina - Negativo;
- 25           Producción de H<sub>2</sub>S - Negativa.

- 1                    Agar nutriente  
Crecimiento vegetativo - Color tostado claro;  
Micelio aéreo - Ninguno;  
Pigmento soluble - Ninguno.
- 5                    Agar almidón nutriente  
Crecimiento vegetativo - Crema a tostado;  
Micelio aéreo - Ninguno;  
Pigmento soluble - Ninguno;  
Hidrólisis del almidón - Moderada.
- 10                   Agar gelatina nutriente  
Crecimiento vegetativo - De color crema;  
Micelio aéreo - Ninguno;  
Pigmento soluble - Ninguno;  
Licuefacción de la gelatina - Moderada.
- 15                   Planchas de gelatina  
Crecimiento vegetativo - Color tostado  
Micelio aéreo - Ninguno;  
Pigmento soluble - Ninguno;  
Licuefacción de la gelatina - Moderada.
- 20                   Trozo de patata  
Crecimiento vegetativo - Moderado, color tostado;  
Micelio aéreo - Escaso, blanco rosado grisáceo;  
Pigmento soluble - Ninguno
- 25                   Suero sanguíneo de Loeffler  
Crecimiento vegetativo - Color crema;

- 1            Micelio aéreo - Ninguno;  
              Pigmento soluble - Ninguno;  
              Licuefacción - Nula.  
              Agar leche descremada
- 5            Crecimiento vegetativo - Color tostado;  
              Micelio aéreo - Escaso, blanquecino;  
              Pigmento soluble - Ligero pardeamiento del medio;  
              Hidrólisis de la caseína - Positiva.  
              Leche de tornasol
- 10           Crecimiento vegetativo - Color entre tostado y marrón;  
              Micelio aéreo - Ninguno;  
              Color - Sin pigmento soluble, el tornasol indica-  
              dor se vuelve azulado;  
              Coagulación y/o peptonización - Peptonización par-  
15           cial, volviéndose alcalino.  
              Leche descremada  
              Crecimiento vegetativo - Color tostado;  
              Micelio aéreo - Ninguno;  
              Pigmento soluble - Ninguno;
- 20           Coagulación y/o peptonización - Peptonización par-  
              cial, volviéndose alcalino.  
              Agar tirosina  
              Crecimiento vegetativo - Color tostado;  
              Micelio aéreo - Mezcla de orquídea (10 gc) y blanco;  
25           Pigmento soluble - Ninguno;

1                    Descomposición de la tirosina - Positiva.

5                    Todas las lecturas antes registradas se tomaron al  
cabo de tres semanas de incubación a 28°C, salvo indica-  
ción en contrario. El pH de los medios utilizados en es-  
tos estudios era aproximadamente neutro, es decir, pH  
6,8-7,2. Las designaciones de color utilizadas en la des-  
cripción están de acuerdo con las definiciones del Color  
Harmony Manual, 4ª Edición (1958), Container Corporation  
of America, Chicago, Illinois.

10                   También se determinó la capacidad de utilizar o  
asimilar diversos hidratos de carbono del Streptomyces  
cattleya. Para este fin, el microorganismo fue cultivado  
en un medio sintético basal (Pridham y Gottlieb) conte-  
niendo 1 % del hidrato de carbono a 28°C, durante tres  
15                   semanas. El pH de los medios empleados en el estudio era  
aproximadamente neutro (6,8-7,2). La Tabla I muestra la  
utilización de estas fuentes de hidratos de carbono por  
el Streptomyces cattleya: + indica buen crecimiento,  
± mal crecimiento y - ningún crecimiento sobre el hidrato  
20                   de carbono particular.

TABLA I

25	Glucosa	+	Maltosa	±
	Arabinosa	-	Manitol	+
	Gelulosa	-	Manosa	±
	Fructosa	±	Rafinosa	-

1	Inositol	-	Ramnosa	-
	Lactosa	-	Sacarosa	<u>+</u>
	Xilosa	<u>+</u>		

5 La intensidad del crecimiento modificando la temperatura, los requisitos de oxígeno y el efecto sobre los nitratos del microorganismo son los siguientes:  
Intervalo de temperatura (agar extracto de levadura-glucosa + sales):

- 10 28°C - Bueno  
37°C - Moderado  
50°C - No hay crecimiento

Necesidades de oxígeno (cultivo en plancha en agar extracto de levadura-glucosa + sales):

- Aerobio  
15 Reducción de nitrato - Positiva.

20 Se sobreentiende que, para la producción de los nuevos antibióticos de esta invención, la misma no se limita al organismo Streptomyces cattleya o a los organismos que responden por completo a las características microscópicas y de crecimiento antes descritas, que se dan con fines ilustrativos. De hecho, se desea y pretende incluir el uso de mutantes producidos a partir del organismo descrito por diversos medios, tales como radiación X, radiación ultravioleta, mostaza nitrogenada, exposición a fagos y similares.

25

1 El nuevo antibiótico de la invención, la tienami-  
cina, es producido durante la fermentación aerobia de  
medios nutrientes acuosos adecuados bajo condiciones  
controladas, por inoculación con el organismo. Streptomyces  
5 cattleya. Son adecuados para la producción de tienamicina  
los medios acuosos como los empleados para la producción  
de otros antibióticos. Estos medios contienen fuentes de  
carbono, nitrógeno y sales inorgánicas asimilables por  
el microorganismo.

10 En general, pueden utilizarse hidratos de carbono  
como azúcares, por ejemplo glucosa, fructosa, maltosa,  
sacarosa, xilosa, manitol y similares y almidones como  
granos, por ejemplo avena, centeno, almidón de maíz, ha-  
rina de maíz y similares, sólo o en combinación como  
15 fuentes de carbono asimilable en el medio nutriente.  
La cantidad exacta de la fuente o fuentes de hidratos de  
carbono utilizada en el medio depende en parte de los  
otros ingredientes del mismo pero, en general, la canti-  
dad de hidratos de carbono habitualmente varía entre al-  
rededor de 1 % y 6 % del peso del medio. Estas fuentes  
20 de carbono pueden ser utilizadas individualmente o pue-  
den combinarse en el medio varias de estas fuentes de  
carbono. En general, pueden utilizarse muchos materia-  
les proteínicos como fuentes de nitrógeno en el proceso  
25 de fermentación. Las fuentes de nitrógeno adecuadas son,

1           por ejemplo, hidrolizados de levadura, levadura prima-  
ria, harina de soja, harina de algodón, hidrolizados  
de caseína, licor de infusión de maíz, solubles de des-  
tilería, o pasta de tomate y similares. Las fuentes de  
5           nitrógeno, sólo o en combinación, se utilizan en pro-  
porciones que oscilan aproximadamente entre 0,2 y 6 %  
del peso del medio acuoso.

          Entre las sales inorgánicas nutrientes que pueden  
ser incorporadas a los medios de cultivo se encuentran  
10          las sales habituales capaces de dar iones sodio, potasio,  
amonio, calcio, fosfato, sulfato, cloruro, carbonato y  
similares. También se incluyen metales traza como cobal-  
to, manganeso, hierro y magnesio.

          Debe observarse que los medios descritos en los  
15          ejemplos son simplemente ilustrativos de la amplia va-  
riedad de medios que pueden ser empleados y no se preten-  
de que sean limitativos.

          La fermentación se lleva a cabo a temperaturas  
comprendidas aproximadamente entre 20 y 37°C; sin embar-  
20          go, para obtener resultados óptimos, es preferible efec-  
tuar la fermentación a temperaturas de unos 22 a 30°C.  
El pH de los medios nutrientes adecuados para cultivar  
el Streptomyces cattleya y producir tienamicina puede  
variar entre 6,0 y 8,0 aproximadamente.

25          Aunque el nuevo antibiótico tienamicina es produ-

1 cido en cultivos superficiales y sumergidos, se prefiere efectuar la fermentación en estado sumergido.

Una fermentación a pequeña escala del antibiótico se lleva a cabo convenientemente inoculando un medio  
5 nutriente adecuado con el cultivo productor de antibiótico y, después de transferir a un medio de producción, permitiendo que la fermentación transcurra a temperatura constante de unos 24°C en un sacudidor, durante varios días.

10 La fermentación es iniciada en un matraz esterilizado de medio, a través de una o más fases de desarrollo de siembra. El medio nutriente para la fase de siembra puede ser cualquier combinación adecuada de fuentes de carbono y nitrógeno. El matraz de siembra se sacude en  
15 una cámara a una temperatura constante de unos 28°C, durante 2 días o hasta que el crecimiento es satisfactorio y parte del cultivo resultante se utiliza para inocular una segunda fase de siembra o el medio de producción. Cuando se utilizan matraces de siembra de fases  
20 intermedias, se desarrollan esencialmente de la misma forma; es decir, parte del contenido del matraz de la última fase de siembra se utiliza para inocular el medio de producción. Los matraces inoculados se sacuden a temperatura constante durante varios días y al terminar  
25 el periodo de incubación, el contenido de los matra

1 ces se centrifuga o se filtra.

5 Para el trabajo a gran escala, es preferible efectuar la fermentación en tanques adecuados provistos de un agitador y medios de aireación del medio de fermentación. De acuerdo con este método, el medio nutriente se prepara en el tanque y se esteriliza calentando a temperaturas de hasta unos 120°C. Al enfriar, el medio esterilizado se inocula con una siembra previamente desarrollada del cultivo productor y se permite que transcurra la fermentación durante un periodo de tiempo de, por ejemplo, 3 a 5 días, mientras que se agita y/o airea el medio nutriente y se mantiene la temperatura a unos 24°C. Este método de producción de tienamicina es especialmente adecuado para la preparación de grandes cantidades del antibiótico.

15

#### PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LA TIENAMICINA

La tienamicina es un sólido blanco muy soluble en agua y de solubilidad limitada en metanol.

20

El peso molecular aparente en soluciones reguladas con fosfato se calcula que es alrededor de 282 Daltons, determinado por ultracentrifugación analítica, utilizando una técnica de sedimentación en columna corta y óptica de absorción ultravioleta para observar el límite de sedimentación de los materiales que absorben a 300 nm. La espectrometría de masas de desorción de

25

1 campo indica un peso molecular de 272. Mediante un análisis de dispersión de energía de rayos X emitidos por el antibiótico bajo el haz de un microscopio electrónico de barrido, se estableció un peso molecular de combinación de 290 ± 20 basándose en el azufre, siendo ese el único elemento de número atómico superior a 9 encontrado en proporciones significativas.

5  
10 La tienamicina responde a la fórmula empírica  $C_{11}H_{16}N_2O_4S$ , como se deduce por espectrometría de masas de alta resolución. La composición elemental calculada correspondiente a esta fórmula empírica es: carbono, 48,52 %; hidrógeno, 5,92 %; nitrógeno, 10,29 %; oxígeno, 23,5 % y azufre, 11,77 %.

15 Un espectro infrarrojo (Figura 1) de la tienamicina, en forma de mull de Nujol, revela los siguientes picos de absorción:

pico definido a 1765  $cm^{-1}$   
picos anchos a 1650 - 1550  $cm^{-1}$ ;  
2800 - 2500  $cm^{-1}$  y  
20 3500 - 3100  $cm^{-1}$ .

Se encontraron otras bandas a 1290, 1245, 1150-1130, 1065, 995, 970, 945-935, 885, 805, 785 y 720  $cm^{-1}$ .

25 Un espectro RMN a 100 MHz de tienamicina liofilizada a partir de  $D_2O$  y examinado a una concentración de 1,5 mg/0,4 ml de  $D_2O$ , conteniendo trazas del 2,2-dimetil-

1 2-silapentano-5-sulfonato sódico utilizado como patrón interno, revela los picos siguientes:

$\delta$  1,275, d, 3H, J=6,8;  $\delta$  3,15, m, 6H;

$\delta$  3,39, d, d, 1H, J=6,0, 2,9;  $\delta$  4,20,

5 m, 2H.

La tienamicina tiene una rotación óptica específica  $[\alpha]_D^{27^\circ C} + 82,7$  (c = 0,1 %, peso/volumen, en una solución acuosa reveladora de fosfato 10 milimolar, pH 6,95).

10 La dispersión óptica rotatoria revela un efecto Cotton positivo sencillo con un pico a 311 nm y un mínimo a 242 nm. El dicroísmo circular revela un máximo positivo a 287,5 nm y un mínimo negativo a 216 nm.

15 El espectro de absorción ultravioleta de la tienamicina tomado en solución acuosa en un intervalo de pH de 4 a 8 presenta un pico a 296,5 nm ( $E_1^1 \frac{\%}{\text{cm}} = 290$ ,  $\epsilon = 7900$ ) y un mínimo a 242 nm ( $E_1^1 \frac{\%}{\text{cm}} = 88$ ). Los espectros tomados inmediatamente después de la preparación de soluciones a pH 2 presentan un desplazamiento rojo  
20 en el máximo de absorción a 309 nm. Los espectros tomados inmediatamente después de ajustar a pH 12 presentan un desplazamiento rojo del máximo de absorción a 300,5 nm.

25 La tienamicina es una sustancia anfótera internamente neutralizada, cuya función ácida tiene un

1 pKa<sub>1</sub> = 3,08 cuando se mide en solución reguladora de fos-  
fato 30 mM, aprovechando el desplazamiento inducido por  
el pH en el espectro de absorción ultravioleta.

5 Se obtienen reacciones coloreadas positivas con  
ninhidrina, yodoplatinato y reactivo de Folin. El ensa-  
yo Sakaguchi es negativo.

10 Cuando la tienamicina se somete a cromatografía  
en capa fina sobre placas de celulosa que contienen un  
indicador fluorescente y se revela con etanol/agua (70:30),  
es detectada a un valor Rf de 0,45 a 0,50 por cada uno de  
los siguientes criterios, empleados separadamente: 1) Bio  
autografía sobre placas de agar sembradas con el organis-  
mo detector Staphylococcus aureus MB-108, denominado en  
adelante Staphylococcus aureus ATCC 6538P; 2) destrucción  
15 de la fluorescencia excitada por la luz ultravioleta inci-  
dente; 3) una reacción de color melocotón después de ro-  
ciar con ninhidrina y calentar; 4) lento blanqueamiento  
del reactivo de yodoplatinato rociado.

20 La movilidad de la tienamicina en varios siste-  
mas de cromatografía adicionales está indicada a conti-  
nuación:

25

	<u>Sistema disolvente</u>	<u>Absorbente</u>	<u>R<sub>F</sub></u>
1	Butanol/ácido acético/agua (40:10:50)	Avicel TLC	0,43
	Etanol/agua (70:30)	Silica Gel G	0,49
		Avicel TLC	0,48
5	n-propanol/agua (70:30)	Silica Gel G	0,31
		Avicel TLC	0,36
	Etanol/agua (70:30)	Cromatograma descendente en papel Whatman nº 1	0,63
10	Etanol/agua (70:30)	TLC Silica Gel HF (Analtech) TLC prelavado con EtOH	0,44

Avicel es la marca registrada de la American Viscose Corporation para la celulosa cristalina. Los valores R<sub>F</sub> se refieren a la distancia desde el origen al centro de bioactividad (determinada por bioautografía sobre Staphylococcus aureus ATCC 6538P) dividida por la distancia desde el origen al frente de disolvente.

El análisis de aminoácidos de un hidrolizado ácido de tienamicina, realizado en un analizador Hitashi-Perkin-Elmer modelo KLA-5, revela un componente principal que reacciona con la ninhidrina, con un tiempo de retención intermedio entre el de la alanina y el de la glicina y que forma un producto de reacción con ninhidrina cuya absorbancia medida a 440 nm es tres veces mayor que la medida a 540 nm. Cuando el antibiótico se trata con ácido per fórmico frío seguido de bromuro de hidrógeno

1            antes de la hidrólisis ácida, de la forma típicamente em  
pleada para convertir los tioéteres y sulfhidrilos en  
sulfonas y ácidos sulfónicos, respectivamente, el análi  
5            sis de aminoácidos revela un componente principal reacti  
vo con la ninhidrina, con un tiempo de retención justa  
mente superior al del ácido aspártico y con unas absor  
bancias del producto de reacción medidas a 540 nm que son  
3,2 veces mayores que las medidas a 420 nm. Este compo  
nente es idéntico a la taurina (ácido 2-aminoetanosulfó  
10            nico) cuando se compara el tiempo de elución de una mues  
tra auténtica que ha sido sometida a una secuencia idént  
tica de oxidación e hidrólisis ácida. De esta compara  
ción se deduce que la proporción de taurina recuperada  
es de 0,8 micromoles por cada miligramo de tienamicina  
15            que entra en la secuencia de reacción.

            La tienamicina presenta una estabilidad óptima  
en solución acuosa cuando se mantiene a concentraciones  
inferiores a 1 mg/ml en presencia de reguladores de fos  
fato que garantizan un pH resultante entre 6 y 7. Por  
20            ejemplo, una solución de 1 mg/ml en agua (pH 7,0), man  
tenida a 0°C, tiene un semiperiodo de duración de 20  
días mientras que a la misma concentración en fosfato po  
tásico 10 mM, pH 7,0, el periodo de semiduración se pro  
longa a 37 días. Sin embargo, cuando una solución de  
25            12 mg/ml de antibiótico en solución reguladora de fos

1           fato 10 mM se mantiene a 10°C, presenta un semiperiodo  
de duración de 3 días solamente. Esta solución, inicial-  
mente de color amarillo pálido, adquiere una coloración  
ambarina intensa durante las 48 horas de almacenamiento.

5           El semiperiodo de duración de la tienamicina a  
valores de pH inferiores a la neutralidad y a la tempera-  
tura ambiente es: 346 minutos, pH 4,0; 30 minutos, pH  
3,0; 6,7 minutos, pH 2,0, utilizándose en cada caso una  
solución reguladora de fosfato 30 mM para establecer el  
10 control del ión hidrógeno. Por encima de la neutralidad  
y a 30°C, el semiperiodo de duración es: 10 minutos, pH  
8,2; 5,7 minutos, pH 8,8 (regulador de borato) y 2,1 minu-  
tos, pH 12 (hidróxido sódico 0,01 M).

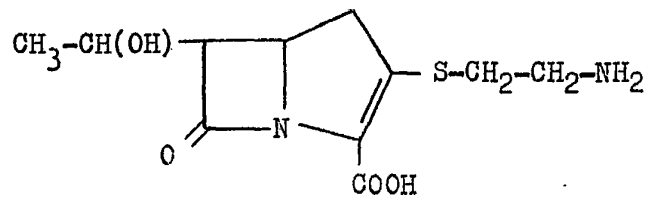
15           La actividad antibiótica y la absorbancia ultra-  
violeta, medida a 296,5 nm, se extinguen en proporción  
estricta y con un semiperiodo de duración de 5,7 minutos  
en las mezclas de reacción que inicialmente contienen  
0,05 micromoles de antibiótico y 4 micromoles de hidro-  
xilamina por mililitro y se incuban a pH 7,0 y 20°C.

20           Se observa un semiperiodo de 2,5 minutos cuando el reac-  
tivo es cisteína, 4 micromoles por mililitro, a pH 7,0  
y 20°C. Finalmente, la actividad antibiótica y la absor-  
bancia se extinguen por exposición a preparaciones de  
β-lactamasa obtenidas por desintegración sónica de una  
25 cepa de Enterobacter cloacae.

1

Se cree que la tienamicina tiene la siguiente estructura molecular:

5



10

La tienamicina se caracteriza además por el siguiente perfil del espectro antibiótico. En el ensayo se emplea el método de difusión de disco de Bauer-Kirby, modificado solamente en el sentido de que la profundidad del ágar aquí empleado es de 2 mm. Los resultados, expresados como diámetro en milímetros de la zona de inhibición se encuentran en la Tabla I.

TABLA I

15

<u>Organismo</u>	Resistencia al antibiótico <sup>A</sup>	<u>Preparación del antibiótico<sup>BB</sup></u>		
		I µg de antibiótico/disco	II	III <sup>AAA</sup>
<u>Staphylococcus aureus 2985</u>	-	12	9,7	6,6
<u>Staphylococcus aureus 2314</u>	P	40	39	38
<u>Streptococcus faecalis 755</u>	-	27,5	26	24
<u>Bacillus subtilis 964</u>	-	48,5	48	46
<u>Escherichia coli 2017</u>	-	30	29	28

25

1

TABLA I (continuación)

	<u>Organismo</u>	Resisten- cia al antibió- tico <sup>a</sup>	<u>Preparación del antibiótico<sup>***</sup></u>		
			I µg de antibiótico/disco	II	III <sup>***</sup>
5	<u>Escherichia coli</u> 2964	P, C	<u>12</u>	<u>9,7</u>	<u>6,6</u>
	<u>Escherichia coli</u> 2482	-	30	28	27
	<u>Klebsiella</u> 2921	P	26	25	25
	<u>Klebsiella</u> 2922	P	26	25	25
10	<u>Enterobacter cloacae</u> 2646	P, C	26	26	25
	<u>Enterobacter cloacae</u> 2647	-	30	30	27,5
	<u>Proteus mirabilis</u> 2830	P, C	23	22	21
	<u>Proteus morgani</u> 2833	P, C	23,5	22	20
15	<u>Serratia</u> 2840	P, C	25	24	23
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> 2824	P, C	31	32	30
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> 3210	P, C	27	27	25
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> 2616	P, C	23	22	20,5

20

<sup>a</sup> P = Penicilinas como las representadas por la ampicilina.  
C = Cefalosporinas como las representadas por la cefalotina

<sup>\*\*\*</sup> I : Preparación cruda (310 unidades/mg)

25

II : Pureza intermedia (13.200 unidades/mg)

III : Prácticamente pura (estimado, 31.000 unidades/mg).

1 La unidad de potencia antibacteriana está definida en la siguiente sección titulada ANALISIS

\*\*\* : Calculado sobre la base de la absorbancia extingui-  
ble por la hidroxilamina descrita más adelante.

5 En otra evaluación del antibiótico esencialmente puro se empleó el método de dilución en ágar. Se aplica un inoculum de  $2 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  organismos como gotita de 0,002 ml sobre la superficie de un ágar Mueller-Hinton que contiene diluciones dobles seriadas de antibiótico desde 0,01 hasta 73  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados (Tabla II) se dan en forma de concentración mínima de inhibición, en  $\mu\text{g/ml}$ , siendo esta la concentración más baja de antibiótico a la cual el crecimiento del organismo de ensayo es inhibido durante un periodo de 18 horas a  $37^\circ\text{C}$ .

15

TABLA II

<u>Organismo de ensayo</u>		<u>Resistencia al antibiótico<sup>A</sup></u>	<u>Concentración mínima de inhibición (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</u>
<u>Staphylococcus aureus</u> 2314		P	0,02
<u>Escherichia coli</u> 2482		-	0,3
<u>Escherichia coli</u> 2964	20	P, C	0,3
<u>Escherichia coli</u> 2017		-	0,15
<u>Klebsiella</u> 2921		P	0,3
<u>Klebsiella</u> 2922		P	0,3
<u>Proteus mirabilis</u> 2830		P, C	4,7
Serratia 2840	25	P, C	4,7

1

TABLA II (continuación)

<u>Organismo de ensayo</u>	<u>Resistencia al antibiótico*</u>	<u>Concentración mínima de inhibición, (µg/ml)</u>
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> 2824	P, C	0,6
5 <u>Pseudomonas aeruginosa</u> 2616	P, C	4,7
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> 3210	P, C	2,4

\* P = Penicilinas como las representadas por la ampicilina  
 C = Cefalosporinas como las representadas por cefalotina.

10

15

20

25

La tienamicina presenta actividad in vivo contra organismos gram-negativos y gram-positivos y por lo tanto es útil para controlar las infecciones bacterianas en los animales huésped. Para determinar la actividad in vivo, se disuelve la tienamicina y se diluye con NaCl 0,15 M, fosfato sódico 0,01 M, pH 7,0, para formar cinco concentraciones al cuádruple de droga para el ensayo. Unos ratones suizos blancos hembras, con un peso promedio de unos 21 g, se infectan intraperitonealmente y subcutáneamente con el organismo de ensayo suspendido en caldo. El número de organismos inyectados se determina por técnicas de recuento en placa normalizadas. En el momento de la infección y de nuevo 6 horas más tarde, algunos de los ratones son tratados intraperitoneal, subcutánea y oralmente con el antibiótico. Para cada concentración de droga ensayada se utilizan cinco ratones. Dos ratones más, no infectados, se tratan con

1 el antibiótico para determinar si la cantidad de agen  
 te inyectada es tóxica. En cada ensayo se incluyen  
 controles de cinco ratones para cada una de las diver  
 sas diluciones del cultivo infeccioso con objeto de  
 5 calcular el número de organismos que es letal al 50 %  
 de los ratones infectados y no tratados (DL<sub>50</sub>). Este  
 cálculo se realiza utilizando los datos de superviven-  
 cia al séptimo día después de la infección, en cuyo mo  
 mento también se calcula la cantidad de droga que debe  
 10 proteger al 50 % de los ratones infectados (DE<sub>50</sub>).

Todos los animales que reciben este ataque y no  
 son tratados con el antibiótico mueren dentro de las  
 48 horas de infección. La eficacia de la tienamicina  
 con una potencia de 30.000 unidades por miligramo es-  
 15 tá registrada en la Tabla III.

TABLA III

<u>Estudio de eficacia (ratones)<sup>a</sup></u>			
<u>Organismo</u>	<u>Número DL<sub>50</sub></u>	<u>Vía de tratamiento, dosis</u>	<u>DE<sub>50</sub> (mg/kg/dosis)</u>
20 <u>Staph. aureus</u> 2949	7	i.p. x 2	0,012
	7	s.c. x 2	0,08
	13	p.o. x 2 <sup>β</sup>	0,67
<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> 3210	7	i.p. x 3 <sup>α</sup>	0,45
	7	s.c. x 3	2,05
25 <u>E. coli</u> 2017	9	i.p. x 2	0,375

- 1             $\alpha = x 3$ , indica el tratamiento en el momento de la dosis infecciosa y al cabo de 2 y 4 horas después de ese hecho.
- $x 2$ , indica el tratamiento en el momento de la dosis infecciosa y de nuevo 6 horas más tarde.
- 5             $\beta =$             los animales se mantuvieron en ayunas durante 24 horas antes de la infección y la terapia.

              Se estableció un bajo orden de toxicidad en mamíferos mediante la observación de ningún efecto adverso durante un periodo de 7 días después de la administración intravenosa de 500 mg de antibiótico por kg de peso corporal en el ratón.

10            La tienamicina es un valioso antibiótico activo contra diversas bacterias gram-positivas y gram-negativas y, por consiguiente, encuentra aplicación en medicina humana y veterinaria. El compuesto de esta invención puede ser utilizado como droga antibacteriana para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias gram-positivas o gram-negativas, por ejemplo contra Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa y Enterobacter cloacae.

15            El material antibacteriano de la invención puede ser utilizado además como aditivos de piensos para animales, para la preservación de alimentos y como desinfectante. Por ejemplo, puede ser empleado en composiciones acuosas a concentraciones que oscilan entre 0,1 y 100 partes de

20            antibiótico por millón de partes de solución con objeto

25

1 de destruir e inhibir el crecimiento de bacterias perju-  
diciales en el equipo médico y dental y como bacterici-  
das en aplicaciones industriales, por ejemplo en las pin-  
turas acuosas y en el agua blanca de las papeleras para  
5 inhibir el crecimiento de bacterias perjudiciales.

El antibiótico de esta invención puede ser uti-  
lizado en diversos preparados farmacéuticos como único  
ingrediente activo o en combinación con uno o más anti-  
bióticos distintos o con una o más sustancias farmacoló-  
10 gicamente activas. Como ejemplo de los primeros, puede  
co-administrarse un antibiótico de aminociclitol como  
la gentamicina con objeto de reducir al mínimo cualquier  
oportunidad de que vuelvan a producirse los organismos  
resistentes. Como ejemplo de los últimos, pueden combi-  
15 narse el difenoxilato y la atropina en formas de dosifi-  
cación destinadas a la terapia de la gastroenteritis. El  
antibiótico puede emplearse en forma de cápsulas o como  
tabletas, polvos o soluciones líquidas o en forma de sus-  
pensiones o elixires. Puede ser administrado por vía  
20 oral, tópica, intravenosa o intramuscular.

Las tabletas y cápsulas para administración oral  
pueden presentarse en forma de dosis unitaria y pueden  
contener excipientes convencionales tales como agentes  
ligantes, por ejemplo jarabe, goma arábica, gelatina,  
25 sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona; cargas,

1           por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato  
          cálcico, sorbitol o glicina; lubricantes, por ejemplo  
          estearato magnésico, talco, polietilenglicol, sílice;  
5           desintegrantes, por ejemplo, almidón de patata o agen-  
          tes humectantes aceptables como laurilsulfato sódico.  
          Las tabletas pueden ser recubiertas por métodos conoci-  
          dos en la técnica. Los preparados líquidos orales pue-  
          den encontrarse en forma de suspensión acuosa u oleosa,  
          soluciones, emulsiones, jarabes, elixires, etc. o puede  
10          presentarse en forma de producto seco, para su reconsti-  
          tución con agua u otros vehículos adecuados antes de su  
          empleo. Estos preparados líquidos pueden contener aditi-  
          vos convencionales tales como agentes suspensores, por  
          ejemplo jarabe de sorbitol, metilcelulosa, glucosa/jara-  
15          be de azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboxime-  
          tilcelulosa, estearato de aluminio en forma de gel o  
          grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes,  
          por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitano o goma  
          arábica; vehículos no acuosos que pueden contener acei-  
20          tes comestibles, por ejemplo aceite de almendra, aceite  
          de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol o  
          alcohol etílico; preservativos, por ejemplo p-hidroxi-  
          benzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico. Los supo-  
          sitorios contienen bases convencionales para suposito-  
25          rios, v.g. manteca de cacao u otro glicérido.

1 Las composiciones para inyección pueden presen-  
tarse en forma de dosis unitarias sin ampollas o en en-  
vases de dosis múltiples con adición de un preservativo.  
Las composiciones pueden adoptar formas como suspensio-  
5 nes, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acu-  
osos y pueden contener agentes de formulación como agentes  
suspensores, estabilizantes y/o dispersantes. Alternati-  
vamente, el ingrediente activo puede encontrarse en for-  
ma de polvo para su reconstitución con un vehículo ade-  
10 cuado, v.g. agua estéril y exenta de pirógenos, antes de  
su empleo.

Las composiciones también pueden prepararse en  
formas adecuadas para su absorción a través de las mem-  
branas mucosas de la nariz y de la garganta o tejidos  
15 bronquiales y pueden adoptar convenientemente la forma  
de pulverizaciones o inhalaciones en polvo o líquidas,  
píldoras, ungüentos para la garganta, etc. Para la medi-  
cación de los ojos y oídos, los preparados pueden presen-  
tarse como cápsulas individuales, en forma líquida o se-  
20 misólida o pueden utilizarse en forma de gotas, etc. Las  
aplicaciones tópicas pueden ser formuladas en bases hi-  
dróforas o hidrofílicas como ungüentos, cremas, lociones,  
pinturas, polvos, etc.

25 Asimismo, además de un vehículo, estas compo-  
siciones pueden contener otros ingredientes tales como

1 estabilizantes, ligantes, antioxidantes, preservativos,  
lubricantes, agentes suspensores, agentes modificadores  
de la viscosidad o agentes aromatizantes y similares.

5 En veterinaria, por ejemplo en el tratamiento  
de pollitos, vacas, corderos, cerdos y similares, la  
composición puede ser formulada, por ejemplo, en forma  
de preparado intramamario en bases de acción prolongada  
o de liberación rápida.

10 La dosis a administrar depende en alto grado  
del estado del paciente en tratamiento, del peso del  
huésped y del tipo de infección, de la vía y frecuencia  
de administración, siendo preferida la vía parenteral  
para las infecciones generalizadas y la vía oral para  
las infecciones intestinales.

15 En el tratamiento de las infecciones bacteria-  
nas en el hombre, el compuesto de esta invención se ad-  
ministra por vía oral o parenteral, siguiendo procedimien-  
tos convencionales para la administración de antibióti-  
cos, en una proporción de alrededor de 2 a 600 mg/kg/día  
20 y preferiblemente alrededor de 5 a 100 mg/kg/día, de pre-  
ferencia en dosis fraccionadas, v.g. 3 a 4 veces al día.  
Pueden ser administrados en dosis unitarias que contie-  
nen, por ejemplo, 25, 250, 500 ó 1000 mg de ingrediente  
activo, con vehículos o excipientes adecuados fisiológi-  
camente aceptables. Las dosis unitarias se encuentran  
25

1 en forma de preparados líquidos como soluciones o sus-  
pensiones o en forma de sólidos en tabletas o cápsulas.  
Naturalmente, se sobreentiende que la dosis óptima en  
cualquier caso dado dependerá del tipo y de la gravedad  
5 de la infección en tratamiento y que se utilizarán do-  
sis más pequeñas para uso pediátrico, encontrándose to-  
dos estos ajustes dentro del alcance del experto en este  
campo.

10 Los caldos de fermentación que contienen el an-  
tibiótico, producidos de acuerdo con los procedimientos  
aquí descritos, presentan unas actividades que oscilan  
aproximadamente entre 50 y 400 unidades por mililitro  
cuando se analizan mediante el ensayo de difusión en dis-  
co, utilizando Staphylococcus aureus ATCC 6538P. Los pre-  
15 parados de antibiótico con una actividad de 2 unidades/mg  
como mínimo, pueden ser purificados y el antibiótico re-  
cuperado por diversos procedimientos. Uno de estos proce-  
dimientos consiste en adsorber la tienamicina en una re-  
sina cambiadora fuertemente catiónica. Son ilustrativas  
20 de estas resinas las del tipo de sulfonato con una matriz  
de estireno-divinilbenceno, por ejemplo la resina de  
ácido poliestirensulfónico nuclear Dowex 50 x 2 (manufac-  
turado por Dow Chemical Co., Midland, Michigan), en el  
ciclo sódico. Otros miembros representativos de la clase  
25 de resinas cambiadoras fuertemente catiónicas son los si-

1            guientes: Dowex 50 x 4, Dowex 50 x 8 (manufacturadas por  
Dow Chemical Co., Midland, Michigan), Amberlite IR120  
(manufacturadas por Rohm & Haas Co., Philadelphia, Pen-  
5            silvania), Duolite C25D (fabricada por Chemical Process  
Co., Redwood City, California), Permutit Q (fabricada por  
Permutit Co., Birmingham, New Jersey); Ionac C.249 (fa-  
bricada por Ionac Chemical Co., Birmingham, New Jersey)  
y Amberlite 200.

10            Un método de obtener tienamicina más purifica-  
da consiste en utilizar filtración de gel a través de un  
gel de poliacrilamida con un tamaño de poro que excluye  
las moléculas con un peso molecular superior a 1800. Un  
gel preferido es el Bio-Gel P-2 (manufacturado por Bio-  
Rad, Richmond, California).

15            El antibiótico adsorbido es fácilmente eluido  
de la resina cambiadora catiónica con soluciones acuosas  
de amoniaco o de bases orgánicas como piridina, picolinas,  
lutidinas, colidinas y alquilaminas. El eluato así obteni-  
do puede ser purificado todavía más, si se desea, por  
20            otros procedimientos de purificación. Así, el eluato pue-  
de ser purificado haciéndolo pasar a través de polímeros  
de poliéster como XAD-7 u 8 o a través de poliestireno,  
polímeros de divinilbenceno reticulados hidrófobos como  
XAD-1, 2 y 4, preferiblemente XAD-2.

25

1                    Un método preferido de recuperación de la tie  
namicina purificada consiste en pasar una solución del  
antibiótico, por ejemplo el caldo de fermentación fil-  
trado, cuyo pH se ha ajustado entre 4 y 5, a través de una  
5                    columna que contiene una resina cambiadora de catión  
fuerte, del tipo de sulfonato, en el ciclo sódico (Do-  
wex 50 x 2). El adsorbato resultante se eluye después  
con un eluyente adecuado, tal como piridina acuosa al 2 %.  
Los eluatos se recogen en fracciones, dependiendo el ta-  
10                    maño de la fracción del tamaño de la columna empleada.  
Se puede purificar más mediante una secuencia de proce-  
sos que implican los siguientes medios cromatográficos:  
resinas cambiadoras de anión del tipo de poliestiren-  
trimetilamonio (v.g. Dowex-1 en el ciclo de cloruro),  
15                    resinas cambiadoras de catión del tipo de poliestirensul-  
fonato (v.g. Dowex-50 en el ciclo de 2,6-lutidinio), re-  
sinas de permeación de gel (v.g. Bio-Gel P-2, una resina  
de poliacrilamida) y absorbentes poliméricos (v.g. XAD-2,  
una resina de poliestireno). La bioactividad de los elua-  
20                    tos se mide analizando el eluato empleando Staphylococcus  
aureus ATCC 6538P como organismo de ensayo.

25                    Los ejemplos que siguen ilustran los métodos  
mediante los cuales pueden obtenerse los productos de es-  
ta invención. Sin embargo, los ejemplos son solamente  
ilustrativos y resultará evidente al que posea una expe-

1 riencia normal en la técnica que esta invención incluye  
los productos funcionalmente equivalentes y los métodos  
para su preparación. Por lo tanto, cualquier modifica-  
ción de los procedimientos aquí descritos que dé lugar  
5 a la formación de un producto idéntico debe ser conside-  
rada como constitutiva de un método análogo. Los procedi-  
mientos descritos son susceptibles de amplias variaciones  
y modificaciones y cualquier pequeña desviación o amplia-  
ción se considera dentro del alcance del operario y com-  
10 prendida dentro de los límites de esta invención.

#### ANALISIS

Los análisis de la actividad antibacteriana se  
realizan mediante el siguiente procedimiento de difusión  
en disco, salvo indicación en contrario. Las placas de en-  
15 sayo se preparan de la siguiente forma. Un cultivo de una  
noche del organismo de ensayo, Staphylococcus aureus  
ATCC 6538P, en caldo nutriente más 0,2 % de extracto de  
levadura, se diluye con caldo nutriente más 0,2 % de ex-  
tracto de levadura hasta formar una suspensión con una  
20 transmitancia del 55 % a una longitud de onda de 660 mμ.  
Esta suspensión se agrega sobre agar nutriente Difco su-  
plementado con 2,0 g/l de extracto de levadura Difco a  
47-48°C, para formar una composición que contiene 33,2 ml  
de la suspensión por litro de agar. Se vierten . 5 ml de  
25 esta suspensión sobre placas Petri de 85 mm de diámetro

1 y estas placas se enfrían y mantienen a 4°C hasta que se utilizan (5 días como máximo).

5 Las muestras del antibiótico que han de ser analizadas se diluyen hasta una concentración apropiada de solución reguladora de fosfato a pH 7. Unos filtros de papel de disco, de 0,5 pulgadas (12,7 mm) de diámetro, se sumergen en la solución de ensayo y se colocan sobre la superficie de la placa; normalmente se colocan dos discos de cada muestra sobre una placa, uno frente a otro.

10 Las placas se incuban durante la noche a 37°C y la zona de inhibición se mide como mm de diámetro. La zona de inhibición medida en mm determina las potencias relativas o, cuando se compara con un patrón de referencia purificado como la cefalotina, la potencia del antibiótico en unidades/ml. La unidad de actividad registrada en los

15 Ejemplos 4 a 7 se basa en soluciones patrón de cefalotina de 8, 4, 2 y 1 µg/ml. Una unidad se define como la cantidad que se calcula que produce la misma inhibición que 1 µg de cefalotina/ml, teniendo esa zona de inhibición

20 un diámetro comprendido entre 16 y 21 mm.

#### EJEMPLO 1

25 Un tubo de cultivo liofilizado de Streptomyces cattleya se abre asépticamente y el contenido se suspende en un tubo que contiene 0,7 ml de sales Davis estériles con la siguiente composición:

1

Sales Davis

Citrato sódico	0,5 g
$K_2HPO_4$	7,0 g
$KH_2PO_4$	3,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
Agua destilada	1000 ml

5

Se utilizan 0,2 ml de esta suspensión para inocular un cultivo inclinado de Medio A (más ágar) de la siguiente composición:

10

Medio A

Autolizado de levadura (Ardamine <sup>1</sup> )	10,0 g
Glucosa	10,0 g
Regulador de fosfato <sup>+</sup>	2,0 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
Agua destilada	1000 ml
pH: ajustado a 6,5 con NaOH	

15

<sup>1</sup>Ardamine: Yeast Products Corporation

<sup>+</sup>Solución reguladora de fosfato

20

$KH_2PO_4$	91,0 g
$Na_2HPO_4$	95,0 g
Agua destilada	1000 ml

Para los tubos inclinados: añadir agar - 25,0 g/l

25

El tubo inclinado inoculado se incuba durante 8 días a 28°C y después se mantiene a 4°C.

1           Se utiliza una parte de las esporas y micelio aé-  
reo de este tubo inclinado para inocular un Erlenmeyer de  
siembra de 250 ml, provisto de tabiques, que contiene  
50 ml de Medio A (sin ágar). Este matraz de siembra se  
5           sacude a 28°C en un sacudidor a 220 rpm (recorrido: 2",  
5 cm) durante dos días, al cabo de los cuales el creci-  
miento es satisfactorio.

          Se inoculan 15 Erlenmeyers de 250 ml, cada uno de  
ellos conteniendo 40 ml de Medio B, con 1 ml por matraz  
10          del cultivo del matraz de siembra. El Medio B tiene la si-  
guiente composición:

Medio B

	Harina de maíz	20,0 g
	Solubles de destilería	10,0 g
15	Harina de soja	15,0 g
	Citrato sódico	4,0 g
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5 g
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
	CoCl <sub>2</sub> .16H <sub>2</sub> O	0,01 g
20	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
	Poliglicol 2000 <sup>***</sup>	0,25% en volumen
	Agua destilada	1000 ml

pH: ajustado a 6,5 con NaOH

25          \*\*\* Poliglicol 2000: Dow Chemical Co.

1            Estos 15 matraces de producción se sacuden a 28°C  
en un sacudidor a 220 rpm (recorrido: 2", 5 cm) durante  
hasta 3 días, realizando ensayos durante el ciclo de fer-  
mentación. Los ensayos se realizan empleando caldo centri-  
5            fugado. Antes del ensayo, el pH del caldo se ajusta como  
se indica en la siguiente tabla.

<u>Edad (horas)</u>	<u>48</u>	<u>53</u>	<u>72</u>
Actividad frente a ATCC 6538P (mm de la zona)	34/40 e	35/41 e	34
10            pH inicial	6,3	5,9	5,0
pH ajustado	-	6,8	6,2

e = enturbiado.

15            Al cabo de 53 horas, se reúnen los caldos de 13 ma-  
traces. Una parte alícuota se centrifuga y analiza. El  
caldo restante se filtra, se ajusta a pH 7 y se liofili-  
zan 500 ml para dar 10,7 g de sólido. Una porción de 1,5 g  
de este sólido se recoge en 25 ml de alcohol n-butíli-  
co/agua (1:99). El pH de la solución es 7,0. Esta solu-  
ción se aplica a una columna de 5 x 118 cm de Bio-Gel  
20            P-2 (200-400 mallas) que ha sido previamente equilibrada  
con alcohol n-butílico/agua. El gel se desarrolla con la  
misma solución a 10 ml/minuto, recogiendo una fracción  
inicial de 650 ml seguida de 75 fracciones de 20 ml cada  
una. La corriente efluente se estudia con un refractóme-  
25            tro diferencial registrador Mecco-matic. En cada fracción  
se determina la actividad antibacteriana. La tienamicina

1 se encuentra en las fracciones 34 a 40, con un máximo  
 en la fracción 37. Se liofilizan 10 ml de la fracción 37  
 para dar 2,0 mg de un sólido. El sólido obtenido se reco-  
 5 ge en 5 ml de agua para su análisis. Las placas de aná-  
 lisis se incuban durante la noche a 28°C. Los resultados  
 se encuentran a continuación:

	<u>Concentración</u>	<u>Tamaño de la zona en milímetros frente al Staph. aureus ATCC 6538P</u>
	80 µg/ml	30 mm
10	40 "	25 mm
	20 "	21 mm
	10 "	17 mm

#### EJEMPLO 2

15 Un tubo de cultivo liofilizado de Streptomyces  
cattleya se abre asépticamente y el contenido se suspen-  
 de en 0,8 ml de sales Davis estériles con la siguiente  
 composición:

	<u>Sales Davis</u>	
	Citrato sódico	0,5 g
20	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g
25	agua destilada	1000 ml

1 Esta suspensión se usa para inocular 4 tubos inclinados de Medio A (más ágar) de la siguiente composición:

Medio A

5 Autolizado de levadura (Ardamine<sup>†</sup>) 10,0 g  
Glucosa 10,0 g  
Regulador de fosfato<sup>‡</sup> 2,0 ml  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05 g  
Agua destilada 1000 ml

10 pH: ajustado a 6,5 con NaOH

<sup>†</sup> Ardamine: Yeast Products Corporation

<sup>‡</sup>Solución reguladora de fosfato

15 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 91,0 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 95,0 g  
Agua destilada 1000 ml

Para tubos inclinados: añadir ágar - 25,0 g/l

Los tubos inclinados inoculados se incuban durante una semana a 28°C y después se mantienen a 4°C.

20 Una parte de las esporas y micelio aéreo de uno de los tubos inclinados se utiliza para inocular un Erlenmeyer de siembra de 250 ml, provisto de tabiques, que contiene 50 ml de Medio A. Este matraz de siembra se sacude a 28°C en un sacudidor a 220 rpm (recorrido: 2",  
25 5 cm) durante dos días, al cabo de los cuales el creci-

1 miento es satisfactorio.

Quince Erlenmeyers de 250 ml, conteniendo cada uno de ellos 40 ml de Medio B, se inoculan con 1 ml por matraz del cultivo del matraz de siembra. El Medio B tiene la  
5 siguiente composición:

Medio B

	Harina de maíz	20,0 g
	Solubles de destilería	10,0 g
	Harina de soja	15,0 g
10	Citrato sódico	4,0 g
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5 g
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 g
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
15	Poliglicol 2000 <sup>**</sup>	0,25 % en volumen
	Agua destilada	1000 ml

pH: ajustado a 6,5 con NaOH

<sup>\*\*</sup> Poliglicol 2000: Dow Chemical Co.

20 Estos matraces se sacuden a 28<sup>o</sup>C en un sacudidor a 220 rpm (recorrido: 2", 5 cm) durante hasta tres días, realizándose análisis durante el ciclo de fermentación. Los análisis se realizan utilizando el líquido que sobrenada en el caldo centrifugado. Los resultados son los si-  
25 guientes:

1	<u>Edad (Horas)</u>	<u>48</u>	<u>53</u>	<u>72</u>
	pH	6,7	6,4	5,5
	Actividad frente a ATCC 6538P	38	40	38 mm

5 Al cabo de 53 horas, se reúnen los caldos de 13 matraces y se filtran. El pH de una porción de 400 ml del filtrado se ajusta a 4,8 con HCl diluido y se adsorbe sobre 140 ml de Dowex 50 x 2 Na<sup>+</sup> a una velocidad de 14 ml/minuto. El adsorbato se lava con 200 ml de agua desionizada y se eluye con piridina al 2 % en agua, recogiendo seis fracciones de 70 ml. El pH de las fracciones se ajusta a 7,0.

Los análisis se realizan sobre todas las fracciones y los diámetros de la zona están tabulados a continuación:

15	<u>Caldo filtrado</u>	
	<u>Dilución</u>	<u>Diámetro de la zona</u>
	1:4	33 mm
	1:8	30 mm
	1:16	27 mm
20	1:32	24 mm

	<u>Fracciones del eluato</u>	
	<u>Dilución</u>	<u>Diámetro de la zona</u>
	1. 1:5	22,5 mm
	2. 1:5	36 mm
25	3. 1:5	20 mm
	4, 5 y 6 1:5	0 mm

1            Estos ensayos indican que el 45 % de la actividad  
se encuentra en los eluatos. La fracción eluída nº 2 se  
liofiliza para dar 117 mg de sólidos.

5            Los 117 mg de sólidos se disuelven en 1,5 ml de al-  
cohol n-butílico/agua (1:99). La solución se aplica a un  
lecho de Bio-Gel P-2, 1,4 x 81,5 cm, que ha sido previa-  
mente equilibrado con alcohol n-butílico/agua. El gel se  
desarrolla con alcohol n-butílico/agua a 1 ml/minuto,  
10           recogiendo fracciones de 2 ml. La corriente efluente se  
estudia con un refractómetro registrador Mecco-matic. En  
las fracciones se analiza la actividad antibacteriana a  
una dilución de 1:20. El pico bioactivo se observa explo-  
rando las fracciones 44 y 53. Se combinan las fracciones  
46 a 49 y la mitad de la fracción 50. Se toma una muestra  
15           de 1 ml de las fracciones combinadas, para volverla a  
analizar y el resto se liofiliza para dar 4,2 mg de an-  
tibiótico parcialmente purificado.

### EJEMPLO 3

20           Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofiliza-  
do de Streptomyces cattleya, y el contenido se suspende  
en 0,8 ml de sales Davis estériles de la siguiente compo-  
sición:

<u>Sales Davis</u>	
25           Citrato sódico	0,5 g
$K_2HPO_4$	7,0 g

1	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,0 g
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
	Agua destilada	1000 ml

5 Esta suspensión se emplea para inocular cuatro tubos inclinados de Medio A (más agar) de la siguiente composición:

	<u>Medio A</u>	
	Autolizado de levadura (Ardamine <sup>✱</sup> )	10,0 g
10	Glucosa	10,0 g
	Regulador de fosfato <sup>†</sup>	2,0 ml
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
	Agua destilada	1000 ml

pH: ajustado a 6,5 empleando NaOH

15 <sup>✱</sup> Ardamine: Yeast Products Corporation

<sup>†</sup> Solución reguladora de fosfato

	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	91,0 g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	95,0 g
20	Agua destilada	1000 ml

Para tubos inclinados: añadir agar - 25,0 g/l

25 Los tubos inclinados inoculados se incuban durante una semana a 28°C y se mantienen a 4°C. Una parte de las esporas y micelio aéreo de uno de los tubos se utiliza para inocular tres Erlenmeyers de siembra de 250 ml, provistos de tabiques, conteniendo cada uno de ellos 50 ml

1 de Medio A. Estos matraces de siembra se sacuden a 28°C en un sacudidor a 220 rpm (recorrido: 2", 5 cm) durante 1 día, al cabo del cual el crecimiento es satisfactorio.

5 Doce Erlenmeyers de 2000 ml, conteniendo cada uno de ellos 250 ml de Medio C, se inoculan con 7 ml cada uno de la suspensión obtenida por combinación aséptica del contenido de los tres matraces de siembra. El Medio C tiene la siguiente composición:

Medio C

10	Harina de maíz	20,0 g
	Solubles de destilería	10,0 g
	Harina de soja	15,0 g
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5 g
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
15	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 g
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
	CaCO <sub>3</sub>	4,0 g
	Poliglicol 2000**	0,25 % en volumen
	Agua destilada	10.000 ml
20	pH: ajustado a 6,5 empleando NaOH	

\*\* Poliglicol 2000: Dow Chemical Co.

25 Estos matraces se sacuden a 28°C en un sacudidor a 220 rpm (recorrido: 2", 5 cm) durante 72 horas. Se reúnen los caldos y una parte alícuota se centrifuga para su análisis. El caldo recogido tiene un pH de 7,4 y el análisis

1 antibacteriano utilizando el líquido que sobrenada del  
caldo centrifugado da 43 mm.

5 Se filtra el caldo y el pH del filtrado se ajusta  
a 4,0 con HCl diluido y se adsorben 3000 ml sobre 300 ml  
de Dowex 50 x 2 Na<sup>+</sup> a una velocidad de 30 ml/minuto. El  
adsorbato se lava con 300 ml de agua desionizada y se  
eluye con piridina al 2 %, recogiendo 8 fracciones de  
15 150 ml. El pH de las fracciones se ajusta a 7,0. Se reu-  
nen las fracciones eluidas números 2 y 3, que totalizan  
10 300 ml y contienen el 48 % del material bioactivo total  
aplicado a la columna Dowex 50 x 2 Na<sup>+</sup>.

15 A través de una columna de 40 ml de Dowex 1 x 2,  
ciclo Cl<sup>-</sup>, se percolan 280 ml de las fracciones reunidas  
de eluato de Dowex 50 x 2 Na<sup>+</sup> a pH 7,0, antes obtenido.  
La resina Dowex se lava con 160 ml de agua desionizada.  
Se combinan el efluente y las fracciones de lavado para  
dar 440 ml de solución. Esta solución se ajusta a pH 8,2  
con hidróxido sódico diluido, se concentra a presión re-  
ducida hasta 300 ml, se ajusta a pH 7,0 con HCl diluido  
20 y se liofiliza para dar 189 mg de sólido.

25 El sólido liofilizado, 189 mg, antes obtenido se  
disuelve en alcohol n-butílico/agua (1:99). Se aplican  
25 ml de la solución a una columna de Bio-Gel P-2 (200-  
400 mallas), de 5 x 108 cm, que ha sido previamente equili-  
brada con alcohol n-butílico/agua. Después el gel se desarrolla

1 con alcohol n-butílico/agua a 6,7 ml/minuto. La corriente  
efluente se estudia con un refractómetro diferencial de  
registro Mecco-matic. Se recoge una fracción anterior de  
500 ml seguida de fracciones de 20 ml cada una. En cada  
5 fracción se analiza la actividad antibacteriana a una di-  
lución de 1:25. Se observa bioactividad en las fracciones  
37 a 42, con un máximo en la fracción 39. Se combinan las  
fracciones 38 a 41, que tienen un volumen total de 80 ml.  
Esta solución se concentra hasta 10 ml a pH 7,0 y se lio-  
10 filiza. El sólido liofilizado, 13,5 mg, tiene una poten-  
cia relativa aproximadamente seis veces mayor que la po-  
tencia de la muestra cargada en la columna de Bio-Gel P-2,  
basándose en una comparación mediante ensayos de difusión  
en disco de Staphylococcus aureus.

15

#### EJEMPLO 4

Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofiliza-  
do de Streptomyces cattleya y el contenido se suspende  
en 0,8 ml de sales Davis estériles de la siguiente compo-  
sición:

20

#### Sales Davis

Citrato sódico	0,5 g
$K_2HPO_4$	7,0 g
$KH_2PO_4$	3,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
Agua destilada	1000 ml

25

1           Esta suspensión se utiliza para inocular cuatro tu-  
bos inclinados de Medio A (más ágar) de la siguiente com-  
posición:

Medio A

5           Autolizado de levadura (Ardamine<sup>\*</sup>)           10,0 g  
            Glucosa                                       10,0 g  
            Regulador de fosfato<sup>+</sup>                    2,0 ml  
            MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O                                0,05 g  
            Agua destilada                            1000 ml

10          pH: ajustado a 6,5 empleando NaOH

<sup>\*</sup> Ardamine: Yeast Products Corporation

<sup>+</sup>Solución reguladora de fosfato

15          KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                                        91,0 g  
            Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                                   95,0 g  
            Agua destilada                            1000 ml

Para tubos inclinados: añadir agar - 25,0 g/l

Los tubos inclinados inoculados se incuban duran-  
te una semana a 28°C y después se mantienen a 4°C.

20          Se transfieren asépticamente 10 ml de Medio A a  
uno de estos tubos, se rascan las paredes para pasar a  
suspensión las esporas y el micelio aéreo y se utilizan  
3,3 ml de esta suspensión para inocular un Erlenmeyer de  
2 litros, provisto de tabiques, que contiene 500 ml de  
25          Medio A. Este matraz de siembra se sacude a 28°C en un  
sacudidor a 160 rpm (recorrido: 2", 5 cm) durante 48 ho-

1 ras, al cabo de las cuales el crecimiento es satisfacto-  
rio.

5 El cultivo de este matraz de siembra se utiliza  
para inocular un tanque de siembra de acero inoxidable  
de 190 litros, que contiene 160 litros de Medio A. Este  
tanque opera a 28°C, empleando una velocidad de agitación  
de 150 rpm y un caudal de aire de 3 pies<sup>3</sup>/minuto (84 dm<sup>3</sup>/  
min), durante 24 horas. Se utiliza un antiespumante, Poli-  
glicol 2000, (Dow Chemical Corp.) a medida que sea nece-  
sario pero de manera que no pase del 0,1 %. Las determi-  
naciones del pH se realizan como siguen:

<u>Edad, horas</u>	<u>0</u>	<u>12</u>	<u>24</u>
pH	6,4	6,4	6,3

15 Se utilizan 43 litros del crecimiento de este tan-  
que de siembra para inocular un fermentador de acero ino-  
xidable de 756 litros, que contiene 467 litros de Medio E,  
donde el Medio E tiene la siguiente composición:

<u>Medio E</u>	
20 Cerelesa	25,0 g
Licor de infusión de maíz (en húmedo)	15,0 g
Solubles de destilería	10,0 g
Medio de semilla de algodón (Pharma- media)	5,0 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 g
25 CaCO <sub>3</sub> (después de ajustar el pH)	3,0 g

1 Poliglicol 2000 0,25 %  
 Agua corriente 1000 ml

pH: ajustado a 7,3 con NaOH

5 Este tanque opera a 24°C, utilizando una velocidad de agitación de 95 rpm y un caudal de aire de 10 pies<sup>3</sup>/minuto (283 dm<sup>3</sup>/min) durante 120 horas. Se añade cuando sea necesario antiespumante adicional, poliglicol 2000, de forma que no pase de 0,1 %. Se realizan los análisis antibacterianos y se obtienen los siguientes resultados:

Edad	pH	Actividad del antibiótico frente a ATCC 6538P (mm)	Dextrosa mg/ml
0	6,8	-	22
12	6,6	-	21,3
24	6,2	-	16,5
36	5,8	25	12,1
48	5,7	25	7,8
60	5,8	21,5	4,3
72	6,1	25	2,5
84	6,6	33	1,6
96	6,7	41,5	1,0
108	6,5	45	1,0
120	6,5	45	0,5

25 Se filtran 400 litros de caldo completo utilizando un filtro prensa y una mezcla auxiliar de filtración. Al filtrado se añaden 1,2 g de sal sódica del ácido (etilen-dinitrilo)tetraacético. El filtrado se enfría a 6°C, se

1 ajusta a pH  $4,0 \pm 0,2$  y se mantiene a  $6^{\circ}\text{C}$ . El filtrado  
frío se adsorbe sobre 38 litros de Dowex 50 x 4  $\text{Na}^+$ ,  
20-50 mallas, a 4 litros/minuto. El adsorbato se lava  
5 con 40 litros de agua desionizada. El adsorbato se elu-  
ye con piridina acuosa al 2 % y se recogen y analizan  
tres fracciones de 19 litros cada una. El análisis anti-  
bacteriano indica que las fracciones de eluato 2 y 3 con-  
tienen 22 % de la actividad aplicada. Las fracciones se  
combinan, se concentran hasta 3,8 litros y se ajustan a  
10 pH 7.

Los 3,8 litros de concentrado antes obtenidos se  
adsorben sobre 2,5 litros de resina Dowex 1 x 2, 50 a  
100 mallas, ciclo de cloruro, a 200 ml/minuto. La resina  
se eluye con agua desionizada a la misma velocidad. Se re-  
15 cogen 10 fracciones de 1 litro y cada fracción se ajusta  
a pH 7,0 a medida que es necesario. Los ensayos indican  
que se encuentra el 75 % de la bio-actividad en las frac-  
ciones 5 a 8. Estas fracciones se combinan y filtran em-  
pleando un filtro Millipore de 0,45 micras. Tres litros  
20 de este filtrado se liofilizan para dar 16,6 g de sólido  
con una potencia de 70 unidades/mg.

Se recogen 4 g del sólido liofilizado antes obtenido  
en 50 ml de solución reguladora de acetato de 2,6-lutidina  
0,1 M. La solución a pH 6,3 se aplica a una columna de  
25 Dowex 50 x 8, preparada como sigue:

1           Se convierten 2,5 litros de resina Dowex 50 x 8  
(200-400 mallas), ciclo hidrógeno, en el ciclo de 2,6-  
lutidina. La resina se equilibra con cinco volúmenes de  
la columna de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M, pH 6,3. Las  
5           dimensiones del lecho de resina equilibrada son 5 x 114  
cm. La columna se desarrolla con solución reguladora  
0,1 M a 14 ml/minuto.

10           La corriente efluente se estudia con un refractó-  
metro diferencial de registro Mecco-matic. El desarrollo  
se realiza hasta que se recogen 220 fracciones de 20 ml  
cada una. Cada fracción alterna desde la 44 hasta la 142  
se analiza a una dilución de 1:50. La bioactividad se  
observa en las fracciones 78 a 136, alcanzando un máximo  
en las fracciones 92 a 94. Se seleccionan y combinan las  
15           fracciones 82 a 116 para dar 700 ml de solución. Esta so-  
lución se divide en dos porciones de 350 ml y se liofili-  
za.

20           Una porción del sólido liofilizado se disuelve en  
solución reguladora de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M, a  
pH 7,0. Se aplican 27 ml de la solución a una columna de  
Bio-Gel P-2 (200-400 mallas), 5 x 108 cm, que ha sido pre-  
viamente equilibrada con solución reguladora 0,1 M. Des-  
pués se desarrolla el gel con la misma solución regulado-  
25           ra a 10 ml/minuto.

1 La corriente efluente se estudia con un refractómetro  
diferencial de registro Mecco-matic. El desarrollo se  
prosigue hasta que se han recogido 105 fracciones de  
20 ml cada una. Todas las fracciones desde la 51 hasta la  
5 90 se analizan a una dilución de 1:50. El análisis pone de  
manifiesto un pico bioactivo en las fracciones 67 a 75,  
con un máximo en las fracciones 70 a 71. Se combinan las  
fracciones 68 a 75 para dar un volumen de 162 ml. A 145 ml  
de las fracciones combinadas, se añaden 3 ml de una solu-  
10 ción reguladora de fosfato sódico 360 mM, pH 7,0, y la  
solución se concentra hasta 9 ml. El concentrado, que con-  
tiene el 78 % del material bioactivo total aplicado a la  
columna de Bio-Gel P-2 se liofiliza para dar 185 mg. Una  
15 parte alícuota residual de 17 ml de las fracciones 68 a  
75 se liofiliza para dar 1,9 mg de sólido que tiene una  
potencia de 1050 unidades/mg.

#### EJEMPLO 5

Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado  
de Streptomyces cattleya y el contenido se suspende en  
20 0,8 ml de sales Davis estériles de la siguiente com-  
posición:

#### Sales Davis

	Citrato sódico	0,5 g
25	$K_2HPO_4$	7,0 g
	$KH_2PO_4$	3,0 g

1	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
	Agua destilada	1000 ml

5 Esta suspensión se utiliza para inocular cuatro tubos inclinados de Medio A (más ágar) de la siguiente composición:

	<u>Medio A</u>	
	Autolizado de levadura (Ardamine <sup>*</sup> )	10,0 g
	Glucosa	10,0 g
10	Regulador de fosfato <sup>+</sup>	2,0 ml
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
	Agua destilada	1000 ml

pH: ajustado a 6,5 con NaOH

15 <sup>\*</sup> Ardamine: Yeast Products Corporation

<sup>+</sup>Solución reguladora de fosfato

	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	91,0 g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	95,0 g
	Agua destilada	1000 ml

20 Para los tubos inclinados: Añadir ágar - 25,0 g/l

Los tubos inclinados inoculados se incuban durante una semana a 28°C y después se mantienen a 4°C.

25 Se transfieren asépticamente 10 ml de Medio A a uno de estos tubos, se rascan las paredes para pasar a suspensión las esporas y el micelio aéreo y se utilizan

1 3,3 ml de esta suspensión para inocular un Erlenmeyer  
de 2 litros, provisto de tabiques, que contiene 500 ml  
de Medio A. Este matraz de siembra se sacude a 28°C en  
un sacudidor a 160 rpm (recorrido: 2", 5 cm) durante  
5 48 horas.

El crecimiento de este matraz de siembra se utiliza  
para inocular un tanque de siembra de acero inoxidable  
de 190 litros, que contiene 160 litros de Medio A.  
Este tanque opera a 28°C, empleando una velocidad de  
10 agitación de 150 rpm y un caudal de aire de 3 pies<sup>3</sup>/minu-  
to (84 dm<sup>3</sup>/min.), durante 24 horas. Se utiliza cuando  
es necesario un antiespumante, poliglicol 2000, (Dow  
Chemical Corp.), pero de forma que no pase del 0,1 %.  
Las determinaciones del pH se realizan como siguen:

15

<u>Edad, horas</u>	<u>0</u>	<u>12</u>	<u>24</u>
pH	6,3	6,6	5,6

Se utilizan 35 litros del crecimiento contenido en  
este tanque de siembra para inocular un fermentador de  
acero inoxidable de 756 litros que contiene 467 litros  
20 de Medio E, de la siguiente composición:

25

<u>Medio E</u>	
Cerelesa	25,0 g
Licor de infusión de maíz (en húmedo)	15,0 g
Solubles de destilería	10,0 g

1	Medio de semilla de algodón (Pharmamedia)	5,0 g
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01 g
	CaCO <sub>3</sub> (después de ajustar el pH)	3,0 g
5	Poliglicol 2000	0,25 %
	Agua corriente	1000 ml

pH: ajustado a 7,3 con NaOH

Este tanque opera a 24°C con una velocidad de agitación de 95 rpm y un caudal de aire de 10 pies<sup>3</sup>/minuto (283 dm<sup>3</sup>/min.), durante 120 horas. Se añade cuando sea necesario un antiespumante, Poliglicol 2000, pero de forma que no pase del 0,1 %. Se realizan los análisis antibacterianos y se obtienen los siguientes datos:

	<u>Edad</u>	<u>pH</u>	<u>Actividad del anti- biótico frente a ATCC 6538P</u>
15	0	6,9	-
	12	6,8	-
	24	6,3	-
	36	6,4	26
20	48	6,3	32
	60	6,4	25
	72	6,8	25
	84	7,0	25
	96	7,1	37
25	108	7,2	41,5
	120	7,1	44,5

1                    Se filtran 400 litros del caldo completo emplean-  
do un filtro prensa y una mezcla de auxiliar de filtra-  
ción en la proporción de 4 % en peso/volumen. Al filtra-  
do se añaden 1,2 g de sal sódica de ácido (etilendinitri-  
5                    lo) tetraacético. El filtrado se enfría a 6°C, se ajusta  
a pH 4,0 ± 0,2 y se mantiene a 6°C. El filtrado frío se  
adsorbe en 38 litros de Dowex 50 x 4 Na<sup>+</sup>, 20-50 mallas,  
a 4 litros/minuto. El adsorbato se eluye con piridina  
acuosa al 2 % y se recogen y analizan tres fracciones  
10                   de 19 litros cada una. Los análisis indican que el 27 %  
de la bioactividad inicial se encuentra en las fraccio-  
nes 2 y 3. Se combinan las fracciones de eluato 2 y 3,  
se concentran hasta 3,7 litros y se ajustan a pH 7.

15                   El concentrado de 3,7 litros de eluato se ajusta a  
pH 7,4 y se adsorbe sobre 2,5 litros de resina Dowex  
1 x 2, ciclo Cl<sup>-</sup> (50-100 mallas), a 200 ml/minuto. Des-  
pués la resina se eluye con agua desionizada a la misma  
velocidad. Se recogen dos fracciones de 2 litros, una  
fracción de 800 ml, una fracción de 4 litros y una frac-  
20                   ción de 2 litros, ajustando el pH a 7,0 cuando sea nece-  
sario. La fracción 4 (4 litros), que contiene 50 % de la  
actividad presente en el concentrado, se filtra utilizan-  
do un filtro Millipore de 0,45 micras. El filtrado trans-  
parente se liofiliza en bandeja para dar 12,4 g de un só-  
25                   lido con una potencia de 270 unidades/mg.

1            Se recogen 4 g del sólido liofilizado en solución  
reguladora de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M, pH 6,3. Se  
restauran 50 ml de la solución a pH 6,3 mediante adición  
de ácido acético, se aplica a una columna de resina  
5            Dowex 50 x 8, en el ciclo de 2,6-lutidina (200-400 mallas),  
con unas dimensiones de 5 x 114 cm, que ha sido previamen-  
te equilibrada con solución reguladora 0,1 M. Después la  
resina se desarrolla con la misma solución reguladora  
0,1 M a pH 6,3, empleando 14 ml/minuto.

10            La corriente efluente se estudia con un refractóme-  
tro diferencial de registro Mecco-matic. El desarrollo  
se realiza hasta que se recogen 150 fracciones de 20 ml  
cada una. Cada fracción alterna desde la 72 a la 150 se  
analiza a una dilución de 1:50. Se observa un pico bio-  
15            activo sencillo en las fracciones 76 a 148, con un máxi-  
mo en las fracciones 92 a 102. Se combinan las fracciones  
86 a 113 para dar 580 ml de solución que contienen 71 %  
de la bioactividad aplicada a la columna Dowex 50 x 8.  
Después esta solución se liofiliza.

20            El sólido liofilizado obtenido se disuelve en solu-  
ción reguladora de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M a pH 7,0  
para preparar 25 ml. Esta solución se aplica a un lecho  
de Bio-Gel P-2 (200-400 mallas), 5 x 108 cm, que ha sido  
previamente equilibrada con solución reguladora 0,1 M.  
25            Después el gel se desarrolla con la misma solución regula-

1 dora a 9 ml/minuto. La corriente efluente se estudia con  
un refractómetro diferencial de registro Mecco-matic. Se  
continúan desarrollando hasta que se recogen 105 fraccio-  
nes de 20 ml cada una. Cada fracción de las 65 a la 80,  
5 se analiza a una dilución de 1:200. El pico bioactivo se  
observa en las fracciones 67 a 76. Se combinan las fraccio-  
nes 70 a 72 y se liofilizan para dar 16,0 mg con una po-  
tencia de 13.800 unidades/mg. Se combinan las fracciones  
69, 73 y 74 y se liofilizan para dar 20,2 mg con una po-  
10 tencia de 5200 unidades/mg.

Los 16 mg de sólido liofilizado se disuelven en so-  
lución reguladora de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M, pH  
7,0, para hacer 10 ml. La solución se aplica a un lecho  
de Bio-Gel P-2 (200-400 mallas), 5 x 108 cm, que ha sido  
15 equilibrada con la misma solución reguladora. El gel se  
desarrolla con solución reguladora a 9 ml/minuto. La co-  
rriente efluente se estudia con un refractómetro diferen-  
cial de registro Mecco-matic. Se continúa desarrollando  
hasta que se han recogido 105 fracciones de 20 ml cada  
20 una. Se analiza cada fracción 65 a 80 a una dilución de  
1:200.

El pico bioactivo se observa en las fracciones 67  
a 75. Se combinan las fracciones 68 a 72 y se liofilizan  
para dar 9,1 mg de una potencia de 15.000 unidades/mg.  
25

1

EJEMPLO 6

Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofiliza-  
do de Streptomyces cattleya y el contenido se suspende en  
50 ml de Medio A estéril contenido en un Erlenmeyer de  
250 ml, provisto de tabiques.

5

El Medio A tiene la siguiente composición:

Medio A

Autolizado de levadura (Ardamine <sup>*</sup> )	10,0 g
Glucosa	10,0 g
Solución reguladora de fosfato <sup>**</sup>	2,0 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Agua destilada	1000 ml

10

pH: ajustado a 6,5 empleando NaOH

15

<sup>\*</sup> Ardamine: Yeast Products Corporation

<sup>\*\*</sup> Solución reguladora de fosfato

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	91,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	95,0 g
Agua destilada	1000 ml

20

El matraz inoculado se sacude a 28°C en un sacudi-  
dor a 220 rpm (recorrido: 2", 5 cm) durante 48 horas. Se  
retiran asépticamente 40 ml del caldo de 48 horas y se  
mezclan con 40 ml de glicerol estéril al 20 % (en volu-  
men/volumen). Se pipetea 2 ml de la mezcla resultante en  
25 viales estériles de un dracma (1,772 g) que después se

25

1 congelan y almacenan en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido.

5 El contenido congelado de los viales se utiliza para inocular un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques, que contiene 50 ml de Medio A. Este matraz de siembra se sacude a 28°C en un sacudidor a 160 rpm, a 28°C, durante 24 horas.

10 Se utilizan porciones de 10 ml de este matraz de siembra para inocular unos Erlenmeyers de 2 litros, provistos de tabiques, que contienen 500 ml de Medio A. Estos matrazes de siembra se sacuden en un sacudidor a 160 rpm, 28°C, durante 24 horas.

15 Se reúne el contenido de estos matraces de siembra y se utilizan 1000 ml para inocular un fermentador de acero inoxidable de 756 litros que contiene 467 litros de Medio A. Este tanque opera a 28°C utilizando una velocidad de agitación de 130 rpm y un caudal de aire de 10 pies<sup>3</sup>/minuto (283 dm<sup>3</sup>/min.), durante 24 horas. Se utiliza Poliglicol 2000 (Dow Chemical Corp.), como antiespumante cuando es necesario pero de forma que no pase del 0,1 %. Se realizan medidas del pH y de la dextrosa y se obtienen los siguientes resultados:

20

<u>Edad (horas)</u>	<u>0</u>	<u>12</u>	<u>24</u>
pH	6,4	6,4	6,6
25 Dextrosa mg/ml	8,1	8,1	8,1

1            Se emplean 453 litros de este cultivo para inocu-  
lar un fermentador de acero inoxidable de 5670 litros  
que contiene 4082 litros de Medio E, de la siguiente  
composición:

5            Medio E

Cerelesa	25,0 g
Licor de infusión de maíz (en húmedo)	15,0 g
Solubles de destilería	10,0 g
10 Medio de semilla de algodón (Pharmamedia)	5,0 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01 g
CaCO <sub>3</sub> (después de ajustar el pH)	3,0 g
Poliglicol 2000	0,25 %
Agua corriente	1000 ml

15            pH: ajustado a 7,3 con NaOH

Este tanque opera a 24°C utilizando una velocidad de agitación de 70 rpm y un caudal de aire de 54,3 pies<sup>3</sup>/minuto (1529 dm<sup>3</sup>/min.), durante 144 horas. Cuando es necesario se añade el antiespumante Poliglicol 2000 pero de forma que no pasa del 0,1 %. Los análisis se realizan utilizando el líquido que sobrenada en el caldo centrifugado. Los resultados están tabulados en la siguiente tabla, bajo el encabezamiento "Actividad del antibiótico frente a ATCC 6538P". También se realizan análisis por el procedimiento de difusión en disco utilizando discos

20

25

1 de papel de filtro de 3/8" (9,5 mm) y placas de ensayo  
 de 10 ml y los resultados están tabulados en la siguien  
 te tabla bajo el encabezamiento "Actividad del antibió-  
 tico (placas de 10 ml)". Las placas de ensayo de 10 ml  
 5 se preparan como siguen: un cultivo de una noche del or-  
 ganismo de ensayo, Staphylococcus aureus ATCC 6538P, en  
 caldo nutriente más 0,2 % de extracto de levadura se di-  
 luye con caldo nutriente más 0,2 % de extracto de leva-  
 dura para formar una suspensión con una transmitancia  
 10 del 40 % a una longitud de onda de 660 milimicras. Esta  
 suspensión se agrega sobre agar nutriente Difco suplemen-  
 tado con 2,0 g/l de extracto de levadura Difco a 47-48°C,  
 para preparar una composición que contiene 33,2 ml de la  
 suspensión por litro de agar. Se vierten 10 ml de esta  
 15 suspensión en placas Petri de 85 ml de diámetro y las  
 placas se enfrían y mantienen a 4°C hasta que se utili-  
 zan (5 días como máximo).

	<u>Edad</u>	<u>pH</u>	<u>Dextrosa mg/ml</u>	<u>Actividad del antibiótico frente a ATCC 6538P (mm)</u>	<u>Actividad del antibiótico (placas de 10 ml) (mm)</u>
20	0	6,6	22,2		
	12	6,3	20,2		
	24	5,8	18,0		0
	36	6,0	13,2		21,5
25	48	6,0	8,6		21,5

	<u>Edad</u>	<u>pH</u>	<u>Dextrosa mg/ml</u>	<u>Actividad del antibiótico frente a ATCC 6538P (mm)</u>	<u>Actividad del antibiótico (placas de 10 ml) (mm)</u>
1	60	5,7	6,4		26,5
5	72	5,8	2,7		25,5
	84	6,2	0,3		27,5
	96	6,4	0,2		36,0
	108	6,4	0		35,0
	120	6,3		41,5	37,0
10	132	5,8			37,5
	144	5,9		43,0	37,5

Los 4,082 litros de caldo de fermentación se fil-  
 tran empleando un filtro prensa de 30 pulgadas (76 cm)  
 y una mezcla auxiliar de filtración en la proporción del  
 4 % en peso/volumen. Se añaden al filtrado 12 g de sal  
 sódica de ácido (etilendinitrilo)tetraacético. El filtra-  
 do se enfría a 6°C, se ajusta a pH 4,5 ± 0,2 y se mantie-  
 ne a 6°C. El filtrado frío se adsorbe sobre 480 litros  
 de Dowex 50 x 4 Na<sup>+</sup>, 20-50 mallas, a unos 48 litros/minu-  
 to. El adsorbato se lava con 480 litros de agua desioni-  
 zada y después se eluye con piridina acuosa al 2 % a ra-  
 zón de 24 litros/minuto y se recogen y analizan a pH 7,0  
 tres fracciones de 300 litros, 520 litros y 240 litros.  
 Los análisis indican que las fracciones eluidas contie-  
 nen 4 %, 16 % y 6 %, respectivamente, de la bioactividad

1 aplicada a la columna Dowex 50 x 4 Na<sup>+</sup>. La fracción de eluato nº 2 se concentra hasta 48 litros y se ajusta a pH 7.

5 Los 48 litros de concentrado se ajustan a pH 7,3 y se adsorben sobre 76 litros de resina Dowex 1 x 2, 50 a 100 mallas, ciclo de cloruro, a 7,6 litros/minuto. La resina se eluye con agua desionizada a la misma velocidad. Se recogen cuatro fracciones, dos de 48 litros, una de 70 litros y una de 48 litros. Las fracciones se  
10 ajustan a pH 7 a medida que se recogen. Los análisis indican que el 68 % de la bioactividad inicial se encuentra en la fracción de 70 litros. Esta fracción se concentra a 18 litros a pH 7,0 y se filtra empleando un filtro Millipore de 0,45 micras. El filtrado se liofiliza en  
15 bandeja para dar 99 g de producto con una potencia de 310 unidades/mg. Se recogen 10 g del sólido liofilizado en solución reguladora de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M, pH 6,3. La solución, 125 ml, se reajusta a pH 6,3 con ácido acético, se aplica a una columna de Dowex 50 x 8  
20 (200-400 mallas) en el ciclo de 2,6-lutidina, con unas dimensiones de 7,6 x 142 cm, que ha sido previamente equilibrada con solución reguladora y se desarrolla con solución reguladora 0,1 M a 25 ml/minuto. Se recoge una fracción inicial de 3 litros seguida de 200 fracciones de  
25 20 ml cada una. Cada cuarta fracción desde la 36 hasta

1 la 192 se analiza a una dilución de 1:200. La bioacti-  
vidad se encuentra en las fracciones 56 a 192, alcanzando  
un máximo en las fracciones 92 a 96. Se combinan las  
fracciones 80 a 136 y se añaden 590 ml de agua desioniza-  
5 da para obtener un volumen de 1760 ml. La solución reuni-  
da diluída, que contiene 62 % de la bioactividad inicial  
aplicada a la columna de Dowex 50 x 8, se liofiliza.

El sólido liofilizado se disuelve en solución re-  
guladora de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M, pH 7,0. Se apli-  
10 can 27 ml de la solución a una columna de Bio-Gel P-2  
(200-400 mallas), 5 x 112 cm, que ha sido previamente equi-  
librada con solución reguladora 0,1 M. Después se desarro-  
lla el gel con la misma solución reguladora a 10 ml/minu-  
to.

15 La corriente efluente se estudia con un refractóme-  
tro diferencial de registro Mecco-matic. Se continúa desa-  
rrollando hasta que se recogen 105 fracciones de 20 ml ca-  
da una. Se analiza cada fracción desde la 70 a la 93, a  
una dilución de 1:300. La bioactividad se encuentra en  
20 las fracciones 73 a 82, alcanzando un máximo las fraccio-  
nes 77 y 78. Las fracciones 75 a 80 se liofilizan para  
obtener 90 mg de antibiótico con una potencia media de  
10.000 unidades/mg.

25 Los 90 mg de sólido liofilizado se recogen en 4 ml  
de solución reguladora de fosfato potásico 0,01 M, pH 7.

1 Esta solución, que contiene 596 unidades de densidad óptica extingible por hidroxilamina (esta medida del contenido de tienamicina será descrita al final de este ejemplo), se aplica a una columna de 1,7 cm de diámetro relleno con 90 ml de XAD-2 prelavado y equilibrada antes de su empleo con 180 ml de solución reguladora de fosfato potásico 0,01 M, pH 7, a 5°C. El XAD-2 se lava antes de ser utilizado sucesivamente con: 1) cinco volúmenes de NaOH 1 N seguido de agua desionizada hasta que el efluente es neutro; 2) cinco volúmenes de HCl 1 N seguido de agua desionizada hasta que el efluente es neutro; 3) cinco volúmenes de cada uno de los disolventes metanol, acetona y etilendiaminotetraacetato tetrasódico 0,001 M y finalmente de agua destilada. Se aplica a vacío a todos los disolventes antes de su empleo.

Después de que la muestra se ha aplicado sobre la columna, se añaden dos veces 2 ml del regulador de fosfato. La columna se desarrolla a 5°C con la solución reguladora a un caudal de 2 ml/minuto. Se recogen fracciones de 4 ml de eluato. Las fracciones obtenidas después de haber recogido 100 ml del eluato y terminando con 253 ml se combinan y concentran en un evaporador rotatorio a vacío y por debajo de 10°C, hasta un volumen de 6 ml.

Esta solución, conteniendo 436 unidades de densi-

1           dad óptica extingüibles por hidroxilamina, se aplica a  
una columna de 1,7 cm de diámetro rellena de 90 ml de  
XAD-2 prelavado como antes y equilibrado a 5°C con agua  
destilada. Después de la muestra se añaden dos porciones  
5           de 2 ml de agua destilada. La columna se desarrolla con  
agua destilada a una velocidad de 2 ml/minuto. Se reco-  
gen fracciones de 4 ml de eluato. Las fracciones obteni-  
das después de haber recogido 100 ml de eluato y terminando  
do con 151 ml se reúnen y concentran en un evaporador  
rotatorio hasta un volumen de 2,73 ml y la solución se  
10           liofiliza para dar 6,49 mg de tienamicina. Se reúnen  
las fracciones obtenidas entre 152 ml y 345 ml y se con-  
centran en un evaporador rotatorio hasta un volumen de  
3,34 ml y se liofilizan para dar 11,53 mg de antibió-  
15           tico. Estas fracciones contienen un total de 369 unida-  
des de densidad óptica extingüibles por hidroxilamina.  
Esto representa una purificación de 3,1 veces sobre el  
material aplicado a la primera columna de XAD-2 y da una  
potencia calculada de 31.000 unidades/mg. El análisis es-  
20           pectrofotométrico de una muestra de este producto presen-  
ta un  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 253$  cuando se miden solución reguladora de  
fosfato, pH 7, a 297 nm.

Absorbancia extingüible por hidroxilamina

25           La proporción de absorbancia medida a 297 nm que  
puede ser atribuída al contenido en antibiótico en las

1 muestras impuras se determina mediante la extinción se-  
lectiva de esta absorbancia (con la consiguiente inacti-  
vación de la actividad del antibiótico) por reacción con  
hidroxilamina diluída.

5 Se preparan unas muestras en solución reguladora  
de fosfato potásico 0,01 M a pH 7,0 de manera que presen-  
ten una  $A_{297}$  inicial comprendida entre 0,05 y 2,0. Se  
añade hidroxilamina neutra, recién preparada ( $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$   
más NaOH hasta un pH final de 7) hasta una concentración  
10 final de 10 mM y se deja que transcurra la reacción a la  
temperatura ambiente durante 30 minutos como mínimo. Cuan-  
do la  $A_{297}$  resultante se substraee de la lectura inicial  
(después de corregir la dilución por el reactivo añadido)  
se obtiene la absorbancia extingüible por la hidroxilami-  
15 na. Las soluciones de tienamicina pura presentan una ab-  
sorbancia extingüible por hidroxilamina del 94,5 %.

#### EJEMPLO 7

Se recogen 10 g de los 99 g de sólido liofilizado  
obtenido por la purificación en Dowex 1 x 2 en el Ejem-  
20 plo 6 en solución reguladora de acetato de 2,6-lutidina  
0,1 M, pH 6,3. La solución, 125 ml, se reajusta a pH 6,3  
con ácido acético, se aplica a una columna de 7,6 x 142 cm  
de Dowex 50 x 8 en el ciclo de 2,6-lutidina que ha sido  
previamente equilibrada con solución reguladora. La co-  
25 lumna se desarrolla con solución reguladora 0,1 M a 35 ml/

1 minuto. Se recoge una fracción inicial de 3,6 litros se-  
guida de 200 fracciones de 20 ml cada una. Cada cuarta  
fracción desde la 6 hasta la 194 se analiza a una dilu-  
ción de 1:200. La bioactividad se encuentra en las frac-  
5 ciones 18 a 178, alcanzando un máximo en las fracciones  
62 a 82. Se combinan las fracciones 42 a 102 y se añaden  
640 ml de agua desionizada para dar 1920 ml. La solución  
reunida diluida, que contiene 63 % de la bioactividad  
aplicada a la columna de Dowex 50 x 8, se liofiliza.

10 El sólido liofilizado se disuelve en solución regu-  
ladora de acetato de 2,6-lutidina 0,1M. pH7. La solución, 25  
ml, se aplica a una columna de 5 x 112 cm de Bio-Gel P-2  
(200-400 mallas), que ha sido previamente equilibrada con  
solución reguladora 0,1 M. Después se desarrolla el gel  
15 con la misma solución reguladora a 10 ml/minuto. La co-  
rriente efluente se estudia con un refractómetro diferen-  
cial de registro Mecco-matic. El desarrollo se continúa  
hasta que se recogen 125 fracciones de 20 ml cada una.  
Cada fracción de la 70 a la 89 se analiza a una dilución  
20 de 1:300. La bioactividad se encuentra en las fracciones  
72 a 81, alcanzando un máximo en la fracción 77. Las  
fracciones 75 a 79 se liofilizan para obtener 100,5 mg  
del antibiótico con una potencia de 8320 unidades/mg.

25 Los 100,5 mg de sólido liofilizado se recogen en  
4 ml de solución reguladora de fosfato potásico 0,01 M,

1        pH 7. Esta solución, que contiene 692 unidades ópticas  
extinguibles por la hidroxilamina, se aplica a una co-  
luna de 1,7 cm de diámetro rellena de 90 ml de XAD-2  
prelavado y equilibrada antes de su empleo con 180 ml  
5        de solución reguladora de fosfato potásico 0,01 M, pH 7,  
a 5°C. El XAD-2 se lava antes de su empleo sucesivamente  
con: 1) cinco volúmenes de NaOH 1 N seguido de agua des-  
ionizada hasta que el efluente es neutro; 2) cinco volú-  
menes de HCl 1 N seguido de agua desionizada hasta que  
10       el efluente es neutro; 3) cinco volúmenes de cada uno  
de los disolventes metanol, acetona, etilendiaminetetra-  
acetato tetrasódico 0,001M y finalmente agua destilada.  
Se aplica a vacío a todos los disolventes antes de su  
uso.

15       Después de aplicar la muestra a la columna, se  
añaden dos porciones de 2 ml de la solución reguladora  
de fosfato. La columna se desarrolla a 5°C con la solu-  
ción reguladora a un caudal de 2 ml/minuto. Se recogen  
fracciones de 4 ml del eluato. Las fracciones obtenidas  
20       después de haber recogido 109 ml de eluato y terminando  
con 309 ml, se combinan. A este eluato combinado se ña-  
den los 11,53 mg de muestra del antibiótico purificado  
con XAD-2, obtenido en el Ejemplo 6, que contiene 186 uni-  
dades de densidad óptica extingible por hidroxilamina.  
25       El eluato combinado junto con el antibiótico añadido se

1 concentra a vacío en un evaporador rotatorio, a una temperatura inferior a 10°C, hasta un volumen de 7 ml.

5 Esta solución, que contiene 720 unidades de densidad óptica extingible por hidroxilamina, se aplica a una columna de 1,7 cm de diámetro rellena con 90 ml de XAD-2 prelavado como antes y equilibrada a 5°C antes de su uso con agua destilada. A continuación de la muestra se añaden dos porciones de 2 ml de agua destilada. La columna se desarrolla con agua destilada a una velocidad de 10 2 ml/minuto. Se recogen fracciones de 4 ml de eluato. Las fracciones obtenidas después de haber recogido 109 ml de eluato y terminando con 301 ml, se reúnen y concentran en un evaporador rotatorio hasta un volumen de 10,3 ml. Esta solución, que contiene 589 unidades de densidad óptica extingibles por hidroxilamina, se liofiliza para dar 23,6 15 mg de antibiótico con una potencia calculada de 30.140 unidades/mg.

20 El antibiótico así preparado es un sólido amorfo blanco con una consistencia fibrosa, una muestra del cual, cuando se expone en un tubo capilar de vidrio a temperaturas elevadas a una velocidad de 3°C por minuto, sufre descomposición sin intervención de una fase líquida en las siguientes etapas: el ablandamiento se produce a 130-140°C con una contracción del volumen del sólido 25 que continúa hasta 170-174°C, a cuya temperatura el mate-

1 rial se vuelve amarillento; observándose sinterización  
y una intensificación progresiva del color a pardo ro-  
jizo en el intervalo de 180 a 200°C encontrándose final-  
mente carbonización y trazas residuales de sólido a  
5 205°C.

Otra muestra de este material presenta por análisis  
espectrofotométrico un pico de absorbancia a 296,5 nm con  
un  $E_1^{1\%}{}_{1\text{ cm}} = 268,2$ . El análisis elemental da los siguientes  
resultados: 1) una pérdida de peso del 5,67 % al secar a  
10 la temperatura ambiente durante 4 horas a vacío y 2) la  
siguiente composición: 47,68 % de carbono, 6,22 % de hi-  
drógeno y 11,48 % de nitrógeno. Estos resultados concuer-  
dan con la fórmula empírica  $C_{11}H_{16}N_{2.04}S \cdot (NH_3)_{0.28}$ , siendo  
la composición elemental calculada correspondiente a esta  
15 fórmula empírica la siguiente: C = 47,68 %; H = 6,13 %;  
N = 11,52 %; S = 11,57 % y O = 23,1 %. El análisis polari-  
métrico de una solución de 1 mg/ml de esta muestra en so-  
lución reguladora de fosfato potásico 10 mM muestra una  
rotación óptica específica  $[\alpha]_D^{27^\circ C} = + 80$ . El espectro in-  
20 frarrojo (Figura 1) de un mull de Nujol de esta muestra  
revela picos de absorción característicos a  $1765\text{ cm}^{-1}$ ,  
 $1650\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ ,  $2800\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$  y  $3500\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ . Un espec-  
tro RMN a 100 MHz de una muestra de este producto disuel-  
ta en  $D_2O$  revela un doblete a  $\delta 1,275$ , una pareja de do-  
25 bletes a  $\delta 3,39$  y multipletes a  $\delta 3,15$  y  $\delta 4,20$ , siendo

1           característicos estos picos de la tienamicina.

          Las composiciones que contienen el antibiótico pueden ser administradas en varias formas de dosis unitarias como, por ejemplo, en forma de dosis sólida o líquida oralmente ingerible. Las composiciones por dosis unitaria, ya sean líquidas o sólidas, pueden contener de 0,1 a 99 % de material activo, siendo la proporción preferida alrededor de 10 a 60 %. La composición puede contener generalmente alrededor de 25 a 1000 mg en peso del ingrediente activo, calculado sobre el peso total de la composición; sin embargo, en general, es preferible emplear una dosis comprendida entre unos 250 mg y 1000 mg. En la administración parenteral, la dosis unitaria está constituida habitualmente por el compuesto puro en una solución acuosa estéril ligeramente acidulada o en forma de un polvo soluble destinado a la disolución. Las formulaciones más representativas pueden ser preparadas por los siguientes procedimientos:

<u>Cápsulas</u>	<u>Por cápsula</u>
20   Tienamicina	400 mg
Lactosa, Farmacopea de Estados Unidos, cantidad suficiente.	

          (Se llenan cápsulas del nº 0, conteniendo aproximadamente 475 mg cada una).

25           En el Ejemplo anterior, se mezclan el compuesto

1 activo y el diluyente para producir una mezcla uniforme  
que después se introduce en cápsulas de gelatina dura  
del nº 0, a mano o mediante una máquina adecuada, según  
5 sea necesario. La mezcla y el llenado se realizan preferi-  
blemente en una zona con una humedad relativa inferior a  
40 %.

	<u>Tabletas</u>	<u>Por tableta</u>
	Tienamicina	330,0 mg
	Fosfato cálcico	192,0 mg
10	Lactosa, Farmacopea de Estados Unidos	190,0 mg
	Almidón de maíz	80,0 mg
	Estearato magnésico	<u>8,0 mg</u>
		800,0 mg

15 En el ejemplo anterior, el componente activo se  
mezcla con el fosfato cálcico, la lactosa y alrededor de  
la mitad del almidón de maíz. La mezcla se granula con  
una pasta al 15 % de almidón de maíz, se tamiza grosera-  
mente y de nuevo se tamiza a través de tamices del nº 16.  
20 Se agrega el resto del almidón de maíz y el estearato  
magnésico y la mezcla se comprime en tabletas, con un  
diámetro de 1/2" (12,7 mm) aproximadamente y un peso de  
800 mg cada una.

25 Alternativamente, el componente activo se mezcla  
con el fosfato cálcico, la lactosa y la mitad del almi-

1           dón de maíz. La mezcla se introduce en una prensa pesada para producir masas compactadas en forma de tabletas. Estas masas se rompen hasta formar gránulos de 16 mallas. Se añaden el resto del almidón de maíz y el estearato  
5           magnésico y la mezcla se comprime en tabletas con un diámetro de 1/2" (12,7 mm) aproximadamente, pesando 800 mg cada una.

	<u>Forma lio (para inyección)</u>	<u>Por vial</u>
	Tienamicina	25 mg
10	Agua para inyección, Farmacopea de Estados Unidos, hasta	5 ml

          En el Ejemplo anterior, el componente activo se disuelve en agua para inyección suficiente, en la proporción indicada. Se filtra la solución a través de mechas  
15       Selas o filtros de membrana Millipore para esterilizar. La solución se subdivide en viales estériles. Los viales y su contenido se congelan y el agua se elimina asépticamente por liofilización. Los viales que contienen el sólido seco estéril se cierran asépticamente.

20       Para restaurar para la administración parenteral, se añaden 5 ml de agua estéril para inyección al contenido de un vial.

25

1	<u>Formas líquidas orales</u>	<u>Por 1000 ml</u>
	Tienamicina	1,0 g
	Sacarosa	600,0 g
	Glucosa	250,0 g
5	Benzoato sódico	1,0 g
	Aceite de naranja concentrado	0,2 ml
	Agua purificada, Farmacopea de Estados Unidos, hasta	1000,0 ml

La sacarosa y la glucosa se disuelven en unos 400 ml de agua, calentando para favorecer la disolución. Se enfría esta solución y se añaden benzoato sódico seguido del aceite de naranja concentrado. La solución se lleva a un volumen de 900 ml aproximadamente con agua y se agrega el antibiótico. La solución se clarifica por filtración a través de un filtro grosero.

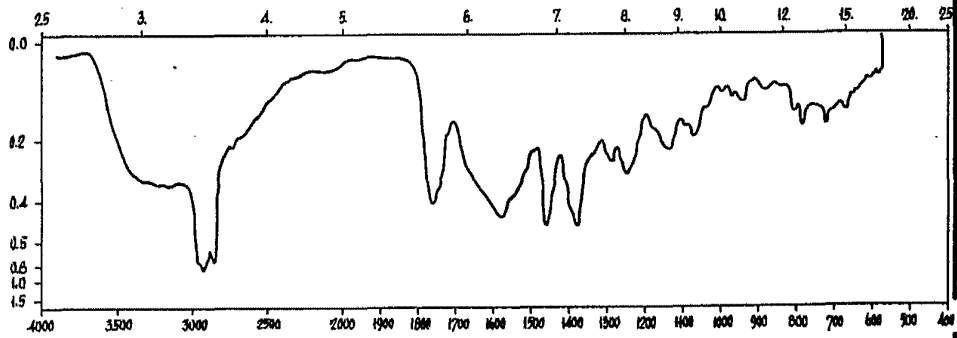
En resumen la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

20

25



Fig. 1.



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 noviembre 1.975  
BERNARDO UNGRIA

P.D.