



ES	453507	A 1
FECHA DE PRESENTACION:		
19.11.76		

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
634.301	21.11.75	Estados Unidos

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D/A61K	

(64) TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE N-ACETILTETRAMICINA

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

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Rahway, New Jersey 07065 Estados Unidos.

(72) INVENTOR (ES)
Jean S. Kahan; Frederick M. Kahan; Robert T. Goegelman; Edeard O. Stapley y Sebastian Hernández, los cuales han cedido sus derechos a la Cía. solicitante.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 amplia de patógenos así como contra las cepas resistentes
de microorganismos particulares.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a un nuevo agente antibió-
tico. Más especialmente, se refiere a una nueva sustancia
antibiótica, denominada aquí N-acetiltienamicina. La inven-
ción comprende el antibiótico en formas diluídas, así como
concentrados crudos y en formas puras.

10 Un objeto de esta invención es proporcionar un nuevo
y útil antibiótico que es muy eficaz en la inhibición del
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 nutritivos con un microorganismo
15 o alternativamente por acetilación de la tienamicina. Otros
objetos resultarán evidentes en la descripción detallada de
esta invención dada en lo que sigue.

20 La nueva sustancia antibiótica de esta invención,
N-acetiltienamicina, se produce cultivando en condiciones
controladas el microorganismo Streptomyces cattleya. El cre-
cimiento de Stitrentomyces cattleya en medios nutritivos tam-
bién da lugar a la producción de tienamicina. La acetila-
ción de la tienamicina constituye otro procedimiento para
la preparación de la N-acetiltienamicina. La preparación de
25 tienamicina por fermentación de Streptomycetes cattleya está

1 descrita aquí y también en las solicitudes de patentes esta-
dounidenses copendientes números de serie 526.992, presenta-
da el 25 de Noviembre de 1974 de Kahan y colaboradores y
613.822, presentada el 18 de Septiembre de 1975, de Goegelman
5 man que es una continuación en parte de la solicitud 534.382,
presentada el 19 de Diciembre de 1974, de Goegelman y cola-
boradores, ahora abandonada, que son incorporadas aquí por
referencia.

Basándose en amplios estudios taxonómicos, el Strepto-
10 tomyces cattleya, aislado de una muestra de tierra, fue
identificado como un actinomiceto y ha sido designado como
MA-4297 en la colección de cultivos de Merck & Co., Inc.
Rahway, N.J. Un cultivo de este microorganismo ha sido colo-
cado en depósito permanente en la colección de cultivos de
15 los Northern Regional Research Laboratories, Northern Uti-
lization Research and Development Division, Agricultural
Research Service, Departamento de Agricultura de Estados Uni-
dos, Peoria, Ill., y ha recibido el número de accesión
NRRL 8057.

20 Las características morfológicas y de cultivo del
Streptomyces cattleya se encuentran en la Tabla I.

TABLA I

Morfología - Las esporoforas son espirales compactas que
aparecen como ramificaciones laterales y terminales so-
25 bre un micelio aéreo. Las esporas son de forma elipsoidal

- 1 a cilíndrica, de un tamaño de $0,9 \mu \times 1,2 \mu$, apareciendo en cadenas de más de 10.

Cultivo

- Agar pasta de tomate-harina de avena
- 5 Crecimiento vegetativo -- Reverso tostado, plano, extendido;
Micelio aéreo -- Orquídea (10 gc) mezclado con blanco;
Pigmento soluble -- Ninguno.
- Agar Czapek-Dox (agar sacarosa-nitrato)
- 10 Crecimiento vegetativo -- Incoloro, plano, extendido;
Micelio aéreo -- Escaso, blanco rosado;
Pigmento soluble -- Ninguno.
- Agar albúmina de huevo
- 15 Crecimiento vegetativo -- Tostado con un matiz orquídea grisáceo, plano, extendido;
Micelio aéreo -- Orquídea (10 gc) mezclado con tonos más claros de orquídea y algo blanco;
Pigmento soluble -- Ninguno.
- Agar glicerol-asparagina
- 20 Crecimiento vegetativo -- Reverso tostado con matices rosa grisáceo, plano, extendido;
Micelio aéreo -- Orquídea (10 gc) mezclado con algo de blanco;
Pigmento soluble -- Ninguno.
- Agar extracto de levadura-glucosa + sales
- 25 Crecimiento vegetativo -- Tostado con un matiz rosa grisáceo;

- 1 Micelio aéreo - Orquídea (10 gc) mezclado con blanco rosado;
Pigmento soluble - Ninguno.
Agar extracto de levadura - Extracto de malta
- 5 Crecimiento vegetativo - Tostado;
Micelio aéreo - Orquídea (10, gc) mezclado con blanco rosado;
Pigmento soluble - Ninguno.
Agar peptona-hierro-extracto de levadura
- 10 Crecimiento vegetativo - Tostado;
Micelio aéreo - Ninguno;
Pigmento soluble - Pardea ligeramente el medio;
Melanina - Negativo;
Producción de H₂S - Negativa.
- 15 Agar nutritivo
Crecimiento vegetativo - Tostado claro;
Micelio aéreo - Ninguno;
Pigmento soluble - Ninguno.
Agar de almidón nutritivo
- 20 Crecimiento vegetativo - Crema a tostado;
Micelio aéreo - Ninguno;
Pigmento soluble - Ninguno;
Hidrólisis del almidón - Moderada.
Agar nutritivo de gelatina
- 25 Crecimiento vegetativo - Coloreado de crema;

- 1 Micelio aéreo - Ninguno;
 Pigmento soluble - Ninguno;
 Licuefacción de la gelatina -- Moderada.
Placas de gelatina
- 5 Crecimiento vegetativo - Tostado;
 Micelio aéreo - Ninguno;
 Pigmento soluble - Ninguno;
 Licuefacción de la gelatina - Moderada.
Tapón de patata
- 10 Crecimiento vegetativo - Moderado, tostado;
 Micelio aéreo - Escaso, blanco grisáceo rosado;
 Pigmento soluble - Ninguno.
Suero sanguíneo de Loeffler
- 15 Crecimiento vegetativo - Coloreado de crema;
 Micelio aéreo - Ninguno;
 Pigmento soluble - Ninguno;
 Licuefacción - Nula.
Agar leche descremada
- 20 Crecimiento vegetativo - Tostado;
 Micelio aéreo - Escaso, blanquecino;
 Pigmento soluble - Pardea ligeramente el medio;
 Hidrólisis de la caseína - Positiva.
Leche de tornasol
- 25 Crecimiento vegetativo - Tostado a marrón;
 Micelio aéreo - Ninguno;

1 Color - Ningún pigmento soluble, el indicador de torna-
sol se vuelve azulado;
Coagulación y/o peptonización - Peptonización parcial,
volviéndose alcalino.

5 Leche descremada
Crecimiento vegetativo - Tostado;
Micelio aéreo - Ninguno;
Pigmento soluble - Ninguno;
Coagulación y/o peptonización - Peptonización parcial,
10 volviéndose alcalino.

Agar tirosina

Crecimiento vegetativo - Tostado;
Micelio aéreo - Mezcla de orquídea (10 gc) y blanco;
Pigmento soluble - Ninguno;
15 Descomposición de la tirosina - Positiva.

Todas las lecturas antes indicadas fueron tomadas al
cabo de tres semanas de incubación a 28°C, salvo indicación
en contrario. El pH de los medios utilizados en estos estu-
dios era aproximadamente neutro, es decir, pH 6,8-7,2. Las
20 designaciones de color utilizadas en la descripción están
de acuerdo con las definiciones del Color Harmony Manual, 4ª
edición (1958), Container Corporation of America, Chicago,
Illinois.

También se determinó en el Streptomyces cattleya su
25 capacidad de utilizar o asimilar diversos hidratos de carbo-

1 no. Para este fin, el microorganismo fue cultivado en un
 medio sintético basal (Pridham and Gottlieb), conteniendo
 1 % del hidrato de carbono a 28°C, durante tres semanas.
 El pH de los medios empleados en el estudio era aproxima-
 5 damente neutro (6,8-7,2). La Tabla II muestra la utiliza-
 ción de estas fuentes de hidratos de carbono por el Strepto-
myces cattleya: + indica un buen crecimiento, ± mal creci-
 miento y - ningún crecimiento sobre el hidrato de carbono
 particular.

10

TABLA II

Glucosa	+	Maltosa	±
Arabinosa	-	Manitol	+
Celulosa	-	Manosa	±
Fructosa	±	Rafinosa	-
Inositol	-	Ramnosa	-
Lactosa	-	Sacarosa	±
Xilosa	±		

15

El grado de crecimiento al variar la temperatura, los
 requisitos de oxígeno y el efecto sobre el nitrato por el
 microorganismo son los siguientes:

20

Intervalo de temperaturas (agar extracto de levadura-glucosa
 + sales):

25

- 28°C - Bueno
- 37°C - Moderado
- 50°C - Crecimiento nulo

1 Requisitos de oxígeno (cultivo en placa en agar extracto de levadura-glucosa + sales):

 Aerobio

Reducción de nitratos - Positiva.

5 Se sobreentiende que para la producción del nuevo antibiótico de esta invención, la misma no se limita al organismo Streptomyces cattleya o a los organismos que responden por completo a las características de crecimiento y microscópicas antes descritas, que se han dado con fines ilustrativos. De hecho, se desea y pretende incluir el uso de

10 mutantes producidos a partir del organismo descrito por diversos medios, tales como radiación X, radiación ultravioleta, mostaza nitrogenada, exposición a fagos y similares.

 El nuevo antibiótico de la invención, N-acetiltienamicina, es producido durante la fermentación aerobia de medios nutritivos acuosos adecuados, bajo condiciones controladas, por inoculación con el organismo, Streptomyces

15 cattleya. Los medios acuosos como los empleados para la producción de otros antibióticos son adecuados para la producción de N-acetiltienamicina. Estos medios contienen fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, asimilables por

20 el microorganismo.

 En general, pueden utilizarse hidratos de carbono como azúcares, por ejemplo glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, xilosa, manitol y similares y almidones como granos,

25

1 por ejemplo avena, centeno, almidón de maíz, harina de maíz
y similares, sólo o en combinación, como fuentes de carbono
no asimilable en el medio nutritivo. La cantidad exacta de
la fuente o fuentes de hidratos de carbono utilizada en el
5 medio depende en parte de los otros ingredientes del mismo
pero, en general, habitualmente la cantidad de hidratos de
carbono varía entre 1 % y 6 % del peso del medio, aproximada-
mente. Estas fuentes de carbono pueden ser utilizadas indi-
vidualmente o pueden combinarse en el medio varias de ellas.
10 En general, pueden utilizarse muchos materiales proteicos
como fuentes de nitrógeno en el proceso de fermentación. Las
fuentes de nitrógeno adecuadas son, por ejemplo, hidroliza-
dos de levadura, levadura primaria, harina de soja, harina
de algodón, hidrolizados de caseína, licor de infusión de
maíz, solubles de destilería o pasta de tomate y similares.
15 Las fuentes de nitrógeno, sólo o en combinación, se utili-
zan en cantidades que oscilan aproximadamente entre 0,2 y
6 % del peso del medio acuoso.

20 Entre las sales inorgánicas nutritivas que pueden in-
corporarse a los medios de cultivo están las sales acostum-
bradas capaces de formar iones sodio, potasio, amonio, cal-
cio, fosfato, sulfato, cloruro, carbonato y similares. Tam-
bién están incluidos los metales traza como cobalto, manga-
neso, hierro y magnesio.

25 Debe observarse que los medios descritos en los ejem-

1 plos son simplemente ilustrativos de la amplia variedad de
medios que pueden emplearse y no se pretende que sean limi-
tativos.

5 La fermentación se realiza a temperaturas comprendi-
das aproximadamente entre 20 y 37°C; sin embargo, para ob-
tener resultados óptimos, es preferible efectuar la fermenta-
ción a temperaturas de unos 22 a unos 30°C. El pH de los me-
dios nutritivos adecuados para cultivar el Streptomyces
cattleya y producir N-acetiltienamicina puede variar entre
10 6,0 y 8,0 aproximadamente.

Aunque el nuevo antibiótico N-acetiltienamicina es pro-
ducido en cultivos superficiales y sumergidos, se prefiere
realizar la fermentación en estado sumergido.

15 La fermentación a pequeña escala del antibiótico se
realiza convenientemente inoculando un medio nutritivo ade-
cuado con el cultivo productor de antibiótico y, después de
transferir a un medio de producción, permitiendo que se pro-
duzca la fermentación a una temperatura constante de unos
24°C, en un sacudidor, durante varios días.

20 La fermentación es iniciada en un matraz esterilizado
de medio, mediante una o más etapas de desarrollo de la se-
milla. El medio nutritivo para la fase de siembra puede ser
cualquier combinación adecuada de fuentes de carbono y nitró-
geno. El matraz de siembra se sacude en una cámara a tempe-
25 ratura constante, a unos 28°C, durante uno o dos días o has-

1 ta que el desarrollo es satisfactorio y parte del cultivo re-
sultante se utiliza para inocular una segunda fase de siem-
bra o el medio de producción. Los matraces de siembra de fa-
ses intermedias, cuando se utilizan, se desarrollan esencial-
5 mente 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 una temperatura constante durante varios días y al final
del periodo de incubación el contenido de los matraces se
10 centrifuga o se filtra.

Para el trabajo a gran escala, es preferible efectuar
la fermentación en tanques adecuados provistos de un agita-
dor y un medio de aireación del medio de fermentación. De
acuerdo con este método, el medio nutritivo se prepara en
15 el tanque y se esteriliza calentando a temperaturas de has-
ta unos 120°C. Después de enfriar, el medio esterilizado se
inocula con un medio de siembra previamente cultivado del
cultivo productor y se permite que transcurra la fermenta-
ción durante un cierto periodo de tiempo, por ejemplo de 3 a
20 5 días, mientras se agita y/o airea el medio nutritivo y se
mantiene la temperatura a unos 24°C. Este método de produc-
ción de N-acetiltienamicina es especialmente adecuado para
la preparación de grandes cantidades del antibiótico.

25

1 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LA N-ACETILTIENTAMICINA

Un espectro de RMN a 100 MHz de la N-acetiltienamicina reveló los siguientes picos:

5 δ 1,27, d, 3H, J \approx 6,5; δ 1,98, s, 3H; δ 2,94, m, 2H;
 δ 3,17, m, 2H; δ 3,38, t, 2H, J \approx 6,5; δ 3,38, m, 1H; δ 4,20, m, 2H.

10 El espectro de RMN de una solución combinada de N-acetiltienamicina obtenida por fermentación y obtenida por acetilación de la tienamicina no se distingue de los de las soluciones individuales. A partir de la dependencia de la λ_{max} del pH, se ha determinado un valor del pK_a de $3,3 \pm 0,1$ para un grupo COOH en la N-acetiltienamicina.

15 Por electroforesis de papel en una solución reguladora de fosfato potásico 0,1 M, pH 7, empleando papel nº 2043-B de Schleicher y Schuell, a un gradiente de voltaje de 50 V/cm, tanto la N-acetiltienamicina obtenida por fermentación como la obtenida por acetilación de la tienamicina migran 2,7 cm hacia el ánodo durante un periodo de 20 minutos a 10°C. El antibiótico es localizado por bioautografía sobre Vibrio parcolans ATCC 8461 (sin secado intermedio del papel) y la migración se mide desde el punto de aplicación al centro de la zona de inhibición.

25 La cromatografía en capa fina empleando láminas recubiertas de celulosa y un sistema disolvente de etanol/agua 70:30 revela un R_f para la N-acetiltienamicina obte-

1

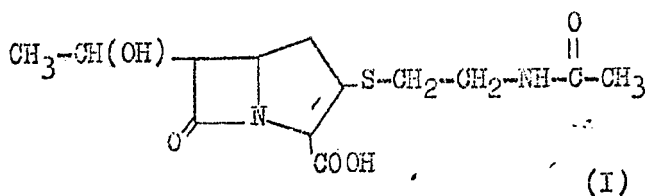
nida por fermentación y para la obtenida por acetilación de la tienamicina de 0,7, detectado por bioautografía sobre Vibrio parcolans ATCC 8461. El valor R_f se refiere a la distancia desde el origen al centro de la bioactividad, dividida por la distancia entre el origen y el frente disolvente.

5

El espectro IR de la N-acetiltienamicina se encuentra en la Figura 1.

Se cree que la N-acetiltienamicina tiene la siguiente estructura molecular:

10



15

La N-acetiltienamicina es caracterizada además por el siguiente perfil del espectro antibiótico. El ensayo emplea el método de difusión en disco de Bauer-Kirby, modificado solamente en lo que se refiere a la profundidad de 2 mm del agar aquí empleada. Los resultados, expresados por el diámetro en milímetros de la zona de inhibición, se encuentran en la Tabla III. Esta Tabla contiene el perfil del espectro antibiótico de la N-acetiltienamicina y el del material obtenido por acetilación de la tienamicina.

25

TABLA III

Organismo de ensayo	Merck núm.	ATCC nº	Resistencia al antibiótico ^a	N-acetiltienamicina ^a 9,85 µg/disco ^{††}	N-acetiltienamicina ^b 10,35 µg/disco ^{††}
<u>Staphylococcus aureus</u>	MB 2985	-	-	37	37
	MB 2314	-	P	37	37
<u>Bacillus subtilis</u>	MB 964	6633	-	43	44,5
<u>Escherichia coli</u>	MB 2884	-	-	31,5	31,5
	MB 2964	-	P, C	28,5	29,5
	MB 2482	-	P	28	28
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	MB 2921	-	P	28	28,5
	MB 2922	-	P	27	30
<u>Enterobacter cloacae</u>	MB 2646	-	P, C	26,5	27
	MB 2647	-	-	29	29
<u>Proteus mirabilis</u>	MB 2830	-	P, C	25	26
<u>Proteus morganii</u>	MB 2833	-	P, C	25,5	25
<u>Serratia</u>	MB 2840	-	P, C	27	27
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	MB 2824	-	P, C	23	24
	MB 2835	-	P, C	11	11 (turbio)
	MB 3286	-	P, C	0	0

^a P = Penicilinas como las representadas por la ampicilina.

C = Cefalosporinas como las representadas por la cefalotina.

^{††} Los cálculos del peso se basan sobre un valor supuesto de E₁^{1%} cm, 301 nm = 290 y una capacidad de extinción de la hidroxilamina del 96 % para el material puro.

^a Preparada por fermentación de Streptomyces cattleya.

^b Preparada por acetilación de tienamicina.

1 La N-acetiltienamicina presenta actividad in vivo con-
tra organismos Gram-negativos y Gram-positivos y, por lo tan-
to, es útil en el control de las infecciones bacterianas en
seres humanos y animales. Para determinar la actividad in
5 vivo, la N-acetiltienamicina se disuelve y se diluye con fos-
fato sódico 0,01 M, pH 7,0, para dar cinco concentraciones
cuádruples de droga para el ensayo. Unos ratones hembra blan-
cos suizos, con un peso medio de unos 21 g, se infectan in-
traperitonealmente con el organismo de ensayo suspendido en
10 caldo. Se determina el número de organismos inyectados por
técnicas normales de recuento de placas. En el momento de la
infección y de nuevo 6 horas más tarde, algunos de los rato-
nes se tratan intraperitonealmente con el antibiótico. Se uti-
lizan cinco ratones para cada concentración de droga ensaya-
15 da. Se incluyen en cada ensayo unos controles de cinco rato-
nes para cada una de las diversas diluciones del cultivo in-
fectante con objeto de calcular el número de organismos que
son letales para el 50 % de los ratones infectados no trata-
dos (DL_{50}). Este cálculo se realiza empleando los datos de su
20 pervivencia del séptimo día después de la infección, en cuyo
momento también se calcula la cantidad de droga que debe pro-
teger al 50 % de los ratones infectados (DE_{50}).

25 Todos los animales atacados de esta forma y no trata-
dos con el antibiótico mueren dentro de las 48 horas subsi-
guientes a la infección. La eficacia de la N-acetiltienamicina

1 está registrada en la Tabla IV:

TABLA IV

Estudios de eficacia (ratones)^a

Organismo	Número, DL ₅₀	Vía de tratamiento, dosis	DE ₅₀ , mg/kg/dosis ^c
5 <u>Staph. aureus</u> 2949	13	i.p. x 2 ^b	0,050

^a CD-1, ratón hembra, peso corporal 21 g.

^b Indica el tratamiento en el momento de la dosis infectante y de nuevo 6 horas más tarde.

10 ^c Peso de la N-acetiltienamicina basado sobre una E₁^{1%} cm, 301 nm estimada = 290 y una capacidad de extinción de la hidroxilamina del 96 % para el material puro.

15 La N-acetiltienamicina es un valioso antibiótico, activo contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y, por consiguiente, encuentra utilidad en medicina y veterinaria. El compuesto de esta invención puede ser utilizado como droga antibacteriana para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, por ejemplo contra Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter cloacae.

20 El material antibacteriano de la invención puede ser utilizado además como aditivo para piensos de animales, para preservar alimentos y como desinfectante. Por ejemplo, puede emplearse en composiciones acuosas a concentraciones que oscilan entre 0,1 y 100 partes o preferiblemente a concentraciones que oscilan aproximadamente entre 1 y 10 partes de anti-

25

1 biótico por millón de partes de solución, para destruir e
inhibir el crecimiento de las bacterias dañinas sobre el
equipo médico y dental y como bactericida en aplicaciones
industriales, por ejemplo en las pinturas acuosas y, en el
5 agua blanca de las fábricas de papel para inhibir el creci-
miento de bacterias perjudiciales.

El antibiótico de esta invención puede ser utilizado
en forma de diversos preparados farmacéuticos, como único
ingrediente activo o en combinación con uno o más antibió-
10 ticos o con una o más sustancias farmacológicamente activas.
Como ejemplo de los primeros, puede coadministrarse un anti-
biótico aminociclitólico como la gentamicina para ampliar
el espectro antimicrobiano y reducir al mínimo cualquier po-
sibilidad de que emerjan organismos residentes. Como ejemplo
15 de los últimos, puede combinarse difenoxilato y atropina en
formas de dosificación destinadas a la terapia de la gastro-
enteritis. El antibiótico puede emplearse en forma de cáps-
ulas o como tabletas, polvos o soluciones líquidas o como
suspensiones o elixires. Puede administrarse por vía oral,
20 tópica, intravenosa o intramuscular.

Las tabletas y cápsulas para administración oral pue-
den encontrarse en forma de dosis unitarias que pueden con-
tener los excipientes convencionales como agentes ligantes,
por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tra-
25 gacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa,

1 azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o gli-
cina; lubricantes, por ejemplo estearato magnésico, talco,
polietilenglicol y sílice; desintegrantes, por ejemplo al-
midón de patata o agentes humectantes aceptables como lau-
5 rilsulfato sódico. Las tabletas pueden ser recubiertas por
métodos conocidos en la técnica. Los preparados líquidos
orales pueden adoptar la forma de suspensiones, soluciones
o emulsiones acuosas u oleosas, jarabes, elixires, etc. o
pueden presentarse como producto seco, para su reconstitu-
10 ción con agua u otros vehículos adecuados antes de su uso.
Estos preparados líquidos pueden contener aditivos conven-
cionales como agentes suspensores, por ejemplo jarabe de
sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelati-
na, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estea-
15 rato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas; agentes
emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbita-
no o goma arábica; vehículos no acuosos que pueden contener
aceites comestibles, por ejemplo aceite de almendras, acei-
te de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol o
20 alcohol etílico; preservativos, por ejemplo p-hidroxiben-
zoatos de metilo o propilo o ácido sórbico. Los suposito-
rios contendrán las bases convencionales para supositorios,
v.g. manteca de cacao u otro glicérido.

25 Las composiciones para inyección pueden presentarse
en forma de dosis unitaria en ampollas o en envases de do-

1 sis múltiples con un preservativo añadido. Las composicio-
nes pueden adoptar formas como suspensiones, soluciones,
emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener
agentes formulatorios tales como agentes suspensores, esta-
5 bilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingredien-
te activo puede encontrarse en forma de polvo para su re-
constitución con un vehículo adecuado, v.g. agua estéril
exenta de pirógenos, antes de su uso.

10 Las composiciones también pueden prepararse en formas
adecuadas para su absorción a través de las membranas mucó-
sas de la nariz y de la garganta o de los tejidos bronquia-
les y pueden adoptar convenientemente la forma de pulveri-
zaciones o inhalaciones en polvo o líquidas, trochas, un-
güentos para la garganta, etc. Para la medicación de los
15 ojos u oídos, los preparados pueden presentarse en forma de
cápsulas individuales, en forma líquida o semisólida o pue-
den ser utilizados como gotas, etc. Las aplicaciones tópi-
cas pueden ser formuladas en bases hidrófobas o hidrofíli-
cas como ungüentos, cremas, lociones, pinturas, polvos, etc.

20 Asimismo, además de un vehículo, estas composiciones
pueden contener otros ingredientes como estabilizantes, li-
gantes, antioxidantes, preservativos, lubricantes, agentes
suspensores, agentes de viscosidad o agentes aromatizantes
y similares.

25 En veterinaria, por ejemplo en el tratamiento de po-

1 llos, vacas, ovejas, cerdos y similares, la composición puede ser formulada, por ejemplo, como preparado intramamario en bases de acción prolongada o de liberación rápida.

5 El programa de dosificación y la vía de administración dependen en alto grado del estado del sujeto en tratamiento, del peso del huésped, de la susceptibilidad del organismo infectante y del grado de infección; se prefiere la vía parenteral para las infecciones sistémicas y la vía oral para las infecciones intestinales.

10 En el tratamiento de las infecciones bacterianas en el hombre, el compuesto de esta invención se administra por vía oral o parenteral, siguiendo procedimientos convencionales para la administración de antibióticos, en una proporción de 2 a 600 mg/kg/día aproximadamente y de preferencia alrededor de 5 a 100 mg/kg/día, preferiblemente en dosis fraccionadas, v.g. 3 a 4 veces al día. Puede ser administrado en 15 dosis unitarias que contienen, por ejemplo, 25, 250, 400, 800 ó 1000 mg de ingrediente activo con vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables adecuados. Las dosis unitarias se encuentran en forma de preparados líquidos, como 20 soluciones o suspensiones o en forma sólida en tabletas o cápsulas. Naturalmente, se sobreentiende que la dosis óptima en cualquier caso dado dependerá del tipo y de la gravedad de la infección en tratamiento y que se emplearán 25 dosis más pequeñas para uso pediátrico, encontrándose todos

1 estos ajustes al alcance del médico.

 Dentro de esta invención están incluidas las sales no
tóxicas y farmacéuticamente aceptables de la N-acetil-tiena-
micina, por ejemplo las sales farmacológicamente aceptables
5 formadas con bases orgánicas e inorgánicas que incluyen, por
ejemplo, las sales metálicas derivadas de hidróxidos, carbona-
tos o bicarbonatos de metales alcalinos o alcalino-térreos,
como las derivadas de sodio, potasio, amonio y calcio y las
sales derivadas de aminas primarias, secundarias o terciarias
10 como monoalquilaminas, dialquileminas, trialquilaminas,
alcanolaminas inferiores, dialcanolaminas inferiores, alqui-
lendiaminas inferiores, N,N-diaralquil-alquilen(inferior)-
diaminas, aralquilaminas, aminoalcanoles inferiores, N,N-di-
alquil(inferior)amino-alcanoles inferiores, ácidos amino-
15 poliamino- y guanidino-alcanoicos inferiores y aminas hetero-
cíclicas nitrogenadas. Son ejemplos representativos las sa-
les derivadas de hidróxido sódico, hidróxido amónico, carbo-
nato sódico, bicarbonato sódico, carbonato potásico, hidróxi-
do potásico, carbonato cálcico, trimetilamina, trietilamina,
20 piperidina, N-etilpiperidina, morfolina, quinina, lisina,
protamina, arginina, procaína, etanolamina, morfina, bencil-
amina, etilendiamina, N,N'-dibenciletildiamina, dietanol-
amina, piperazina, dimetilaminoetanol, 2-amino-2-metil-1-
propanol, teofilina, N-metilglucamina y similares.

25 Las sales del compuesto de esta invención pueden prepa-

1 rarse por métodos convencionales muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, las monosales, como la sal monosódica, obtenidas tratando un equivalente de hidróxido sódico con un
equivalente del producto (I) en un disolvente adecuado. Tam
5 bién las sales mixtas con cationes divalentes pueden prepararse combinando un mol de una base divalente con un mol del producto (I) más un equivalente de otro ácido. Alternativamente, las sales pueden obtenerse tratando un equivalente de una base con un catión divalente, como hidróxido cálcico, con un equivalente del producto (I). Las sales de esta
10 invención son derivados no tóxicos y farmacológicamente aceptables que pueden utilizarse como ingrediente activo en formas farmacéuticas de dosis unitarias adecuadas. Asimismo, pueden combinarse con otras drogas para formar composiciones con un amplio espectro de actividad.

15 Los caldos de fermentación que contienen el antibiótico, producidos de acuerdo con los procedimientos aquí descritos, presentan actividades que oscilan aproximadamente entre 0,1 y 4 μ g por mililitro. Los preparados antibióticos
20 pueden purificarse y recuperarse el antibiótico por diversos procedimientos. Uno de estos procedimientos consiste en pasar el caldo filtrado que contiene la N-acetiltienamicina a través de una columna de una resina cambiadora de catión fuerte. Son ilustrativas de estas resinas las del tipo de
25 sulfonato con una matriz de estirendivinilbenceno, por ejem

1 plo la resina de ácido poliestirensulfónico nuclear
Dowex 50 x 2 (manufacturada por Dow Chemical Co., Midland,
Michigan), en el ciclo sódico. Otros miembros representati-
vos de la clase de resinas cambiadoras de catión fuertes son
5 las siguientes: Dowex 50 x 4, Dowex 50 x 8 (manufacturadas
por Dow Chemical Co., Midland, Michigan), Amberlite IR120
(manufacturada por Rohm & Haas Co., Philadelphia, Pensilva-
nia), Duolite C25D (manufacturada por Chemical Process Co.,
Redwood City, California), Permutit Q (manufacturada por
10 Permutit Co., Birmingham, New Jersey), Ionac C-249 (manufac-
turada por Ionac Chemical Co., Birmingham, New Jersey) y
Amberlite 200.

El líquido que sale de la resina cambiadora de catión
conteniendo el antibiótico N-acetiltienamicina puede ser pu-
15 rificado de nuevo, si se desea, mediante otros procedimien-
tos de purificación. Puede observarse que la tienamicina
permanece adsorbida en la resina cambiadora de catión fuer-
te. Por consiguiente, el procedimiento de separación de es-
tos dos compuestos es claramente diferenciable.

20 Uno de estos procedimientos consiste en adsorber la
N-acetiltienamicina en una resina cambiadora de anión fuerte-
mente básica. Son ilustrativas de estas resinas cambiadoras
de anión fuertemente básicas las que contienen una matriz
de estireno-divinilbenceno, por ejemplo la resina de amonio
25 cuaternario nuclear poliestirénica Dowex 1 x 2 (manufactu-

1 rada por Dow Chemical Co., Midland, Michigan) en el ciclo
de cloruro. Otros miembros representativos de esta clase
de resinas cambiadoras fuertemente básicas son las siguien
tes: Duolite A-40, A-42, A-101, A-102 y A-114 (manufatura-
5 das por Chemical Process Co., Redwood City, California);
Amberlite IRA-400, IRA-401 e IRA-410 (manufacturadas por
Rohm and Haas, Washington Square, Philadelphia 5, Pensilva-
nia). El antibiótico N-acetiltienamicina contenido en el
eluato puede ser purificado de nuevo pasándolo por una co-
10 lumna rellena con un éster acrílico polimérico de polari-
dad intermedia, tal como XAD-7 u 8 o a través de polímeros
hidrófobos, no polares, de poliestireno-divinilbenceno re-
ticulado, tal como XAD-1, 2 y 4, preferiblemente XAD-2.
(Las resinas XAD-1, 2, 4, 7 y 8 son manufacturadas por Rohm
and Haas, Washington Square, Philadelphia, 5, Pensilvania).

15 Un método de obtención de N-acetiltienamicina más puri-
ficada consiste en utilizar la filtración de gel a través
de un gel de poliacrilamida con un tamaño de poro que exclu-
ye las moléculas con un peso molecular mayor de 1800, tal
20 como Bio-Gel P-2 (manufacturado por Bio-Rad, Richmond, Ca-
lifornia).

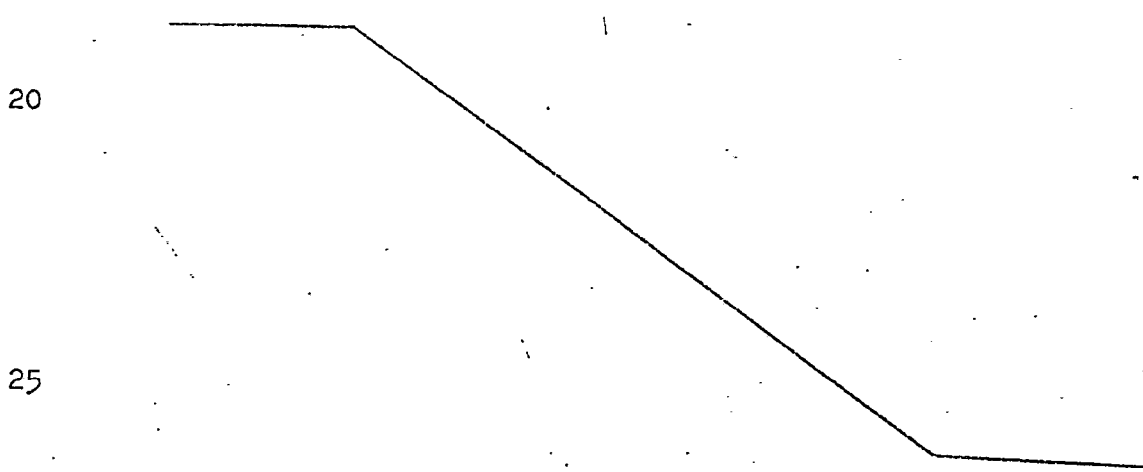
25 Un método preferido de recuperación de N-acetiltienami-
cina purificada consiste en pasar una solución del antibió-
tico, por ejemplo el caldo de fermentación filtrado, cuyo
pH se ha ajustado entre 4 y 5, a través de una columna que

1 contiene una resina cambiadora de catión fuerte del tipo
de sulfonato, en el ciclo sódico (Dowex 50 x 4). El líquido
recogido puede ser purificado de nuevo mediante una se-
cuencia de procesos que implican los siguientes medios cro-
5 matográficos: resinas cambiadoras de anión del tipo de po-
liestireno-trimetilamonio (v.g. Dowex 1 x 2 en el ciclo de
cloruro), absorbentes poliméricos (v.g. XAD-2, una resina
de poliestireno), Dowex 1 x 4 en el ciclo de cloruro y re-
sinas de permeación de gel (v.g. Bio-Gel P-2, resina de po-
10 liacrilamida). La bioactividad de los eluatos se mide ana-
lizando el eluato empleando Staphylococcus aureus ATCC
6538P como organismo de ensayo o, cuando la pureza lo per-
mita, por absorbancia extingible por hidroxilamina. Un
método preferido de obtención de la N-acetiltienamicina a
15 partir del caldo de fermentación es el descrito en la Ta-
bla V.

La N-acetiltienamicina, el antibiótico de esta inven-
ción, también puede ser preparada por acetilación de tie-
namicina. La acetilación se realiza con haluro de acetilo
20 o preferiblemente con anhídrido acético. La tienamicina
se disuelve en un disolvente inerte adecuado como dimetil-
formamida y se trata con un exceso de agente acetilante a
una temperatura comprendida entre -10 y 25°C, pero prefe-
riblemente alrededor de 0°C. La reacción es completa en un
25 periodo de 1 minuto a 1 hora aproximadamente. Habitualmen-

1 te es suficiente un tiempo de reacción de unos 10 minutos
a 0°C. La N-acetiltienamicina cruda obtenida por acetila-
ción de la tienamicina puede ser purificada por el procedi-
miento antes descrito para la purificación de los caldos de
5 fermentación filtrados que contienen N-acetiltienamicina.

Un método preferido de purificación de la N-acetil-
tienamicina obtenida por acetilación consiste en adsorber
el material crudo en una resina cambiadora de anión como
Dowex 1 x 4 en el ciclo de cloruro y eluir con una solución
10 acuosa salina. Una solución acuosa salina adecuada contiene
cloruro sódico, cloruro amónico y amoníaco, preferiblemente
a unas concentraciones de 0,07 M, 0,005 M y 0,0001 M, res-
pectivamente. Se combinan y concentran las fracciones que
contienen el producto. El concentrado puede ser purificado
15 por filtración de gel a través de un gel de poliacrilamida.
Un gel preferido es el Bio-Gel P-2 eluido con agua desioni-
zada.



1 Los ejemplos que siguen ilustran los métodos mediante
los cuales pueden obtenerse los productos de esta invención.
Sin embargo, los ejemplos son solamente ilustrativos y resul-
tará evidente al que posea una experiencia normal en este
5 campo que esta invención incluye los productos funcionalmen-
te equivalentes y los métodos para su preparación. Por lo
tanto, cualquier modificación de los procedimientos aquí
descritos que dé lugar a la formación de productos funcional-
mente equivalentes debe considerarse como constitutiva de
10 un método análogo. Los procedimientos descritos son suscepti-
bles de amplias variaciones y modificaciones y cualquier des-
viación o ampliación menor se considera dentro del alcance
del experto en esta técnica y comprendida dentro de los lí-
mites de esta invención.

15 PROCEDIMIENTO DE ANALISIS PARA EL ANTIBIOTICO N-ACETIL-
TIENAMICINA

I. Bioanálisis

20 Los análisis de la actividad antibacteriana se reali-
zan mediante el siguiente método de difusión en disco, uti-
lizando Vibrio percolans ATCC 8461 o Staphylococcus aureus
ATCC 6538P como organismo de ensayo.

Las placas que contienen Vibrio percolans ATCC 8461
se preparan como sigue:

25 Se suspende un cultivo liofilizado de Vibrio percolans
ATCC 8461 en 15 ml de un medio esterilizado que contiene

1 8 g/l de caldo nutritivo Difco y 2 g/l de extracto de levadura en agua destilada (denominado en lo que sigue NBYE).
El cultivo se incuba durante la noche en un sacudidor rotatorio a 28°C. Este cultivo se utiliza para inocular la superficie de tubos inclinados que contienen 1,5 % de agar
5 en NBYE y los tubos inclinados inoculados se incuban durante la noche a 28°C y después se conservan en un frigorífico.

Los tubos inclinados refrigerados preparados a partir de un solo cultivo liofilizado se utilizan durante hasta
10 cuatro semanas a partir de su preparación, como sigue: se dispersan 4 ml de inóculum del tubo inclinado en 50 ml de NBYE contenidos en un Erlenmeyer de 250 ml. El cultivo se incuba durante la noche en un sacudidor rotatorio a 28°C y después se diluye hasta una densidad tal que se obtenga
15 una transmitancia del 50 % a 660 nm. Se añaden 33,2 ml de este cultivo diluido a 1 litro de NBYE conteniendo 15 g de agar y se mantiene a 46°C. El medio conteniendo agar inoculado se vierte en placas petri de plástico de 100 x 15 mm, a razón de 5 ml por placa, se enfría y se mantiene a 2-4°C
20 durante hasta 5 días antes de su uso.

Las placas que contienen Staphylococcus aureus ATCC 6538P se preparan como sigue:

Un cultivo de una noche del organismo de ensayo, Staphylococcus aureus ATCC 6538P en caldo nutritivo más
25 0,2 % de extracto de levadura se diluye con caldo nutritivo

1 más 0,2 % de extracto de levadura para formar una suspen-
sión con una transmitancia del 55 % a una longitud de onda
de 660 nm. Esta suspensión se agrega a un agar nutritivo
Difco suplementado con 2,0 g/l de extracto de levadura
5 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 esta suspensión en placas petri de 85 mm de diámetro y
estas placas se enfrían y mantienen a 4°C hasta que se uti-
lizan (5 días como máximo).

10 Unas muestras del antibiótico a analizar se diluyen
hasta la concentración apropiada en tampón de fosfato a
pH 7. Se sumergen en la solución de ensayo unos discos de
papel de filtro de 1/4 ó 1/2 pulgadas de diámetro (6,35 ó
12,7 mm) y se colocan sobre la superficie de la placa de
15 ensayo. Las placas se incuban a 37°C durante la noche y la
zona de inhibición se mide como mm de diámetro. La zona de
inhibición medida en mm determina las potencias relativas.

II. Absorbancia extingüible por hidroxilamina

20 La proporción de absorbancia medida a 301 nm que pue-
de ser atribuída al contenido en antibiótico en las mues-
tras impuras se determina por la extinción selectiva de es-
ta absorbancia (con la consiguiente inactivación de la ac-
tividad del antibiótico) por reacción con hidroxilamina di-
luída.

25 Las muestras que contienen el antibiótico a ensayar

1 se preparan en solución reguladora de fosfato potásico
0,01 M a pH 7 para que presenten una A_{301} inicial compren-
dida entre 0,1 y 1,0. Se añade hidroxilamina neutralizada,
recién preparada ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ más NaOH hasta un pH final de 7)
5 hasta una concentración final de 10 mM y se deja que la reac-
ción progrese a la temperatura ambiente durante 30 minutos
como mínimo. Cuando se sustrae la A_{301} resultante de la
lectura inicial (después de corregir la dilución por el
reactivo añadido) se obtiene la absorbancia extingible por
10 hidroxilamina. Las soluciones de N-acetiltienamicina pura
presenta una absorbancia extingible por hidroxilamina del
96,0 %.

EJEMPLO 1

15 Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado
de Streptomyces cattleya NRRL 8057 y el contenido se sus-
pende en un tubo que contiene 0,7 ml de sales Davis estéri-
les con la siguiente composición:

Sales Davis

20	Citrato sódico	0,5 g
	K_2HPO_4	7,0 g
	KH_2PO_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
25	Agua destilada	1000 ml

1 Se emplean 0,2 ml de esta suspensión para inocular un tubo inclinado de cultivo de Medio A (más agar) con la siguiente composición:

Medio A

5	Autólizado de levadura (Ardamine [†])	10,0 g
	Glucosa	10,0 g
	Tampón de fosfato ⁺	2,0 ml
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
	Agua destilada	1000 ml
10	pH ajustado a 6,5 con NaOH	

† Ardamine: Yeast Products Corporation

⁺Solución tampón de fosfato

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

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

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

20 Se utiliza una porción de las esporas y del micelio aéreo de este tubo inclinado para inocular un Erlenmeyer de siembra de 250 ml, provisto de tabiques, conteniendo 50 ml de Medio A (sin agar). Este matraz de siembra se sacude a 28°C en un sacudidor a 220 rpm (recorrido, 2 pulgadas, 25 5 cm) durante 2 días, al cabo de los cuales el crecimiento

1 es satisfactorio.

Se inoculan 15 Erlenmeyers de 250 ml, conteniendo ca
da uno de ellos 40 ml de Medio B, con 1 ml por matraz del
cultivo del matraz de siembra. El Medio B tiene la siguien-
5 te 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 ₂ .2H ₂ O	0,5 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01 g
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
15	Poliglicol 2000 ^{***}	0,25% en volu men
	Agua destilada	1000 ml
	pH ajustado a 6,5 con NaOH	

^{***} Poliglicol 2000: Dow Chemical Co.

20 Estos 15 matraces de producción se sacuden a 28°C en
un sacudidor a 220 rpm (recorrido, 2", 5 cm) durante 53 ho-
ras. En el momento de la recolección (53 horas de edad), el
caldo de los 15 matraces se reúne y se centrifuga una parte
alícuota para análisis. Antes del análisis, el pH del caldo
25 centrifugado se ajusta a 6,5 desde 5,9 con NaOH.

1 Los análisis se realizan sobre placas de ensayo de Staphylococcus aureus ATCC 6538P y Vibrio parcolans ATCC 8461, empleando discos de 1/2" (12,7 mm) sumergidos en el líquido que sobrenada en el caldo centrifugado.

5 Los resultados de los análisis son los siguientes:

<u>Actividad sobre ATCC 6538P</u> <u>(mm de la zona)</u>	<u>Actividad sobre ATCC 8461</u> <u>(mm de la zona)</u>
39/44 LT	35/44 LT

LT = ligeramente turbio.

10 Se ajustan 200 ml de caldo filtrado a pH 8,0 y se adsorben sobre 10 ml de resina Dowex 1 x 2 en el ciclo de cloruro, a 2 ml/minuto, recogiendo la corriente efluente agotada en fracciones de 10 x 20 ml.

15 El adsorbato se eluye con 90 % de metanol, 10 % de agua y 3 % de cloruro amónico en volumen/volumen/peso, recogiendo el eluato en 10 fracciones de 5 ml. Las fracciones de eluato 1 a 6 se combinan y concentran a vacío para separar el metanol. El concentrado se analiza por el procedimiento de difusión en disco empleando un disco de 0,5" 20 (12,7 mm) de diámetro conteniendo 100 µl de solución de antibiótico contra Staphylococcus aureus MB-2985 y da una zona de 28 mm de diámetro.

Las placas de ensayo de MB-2985 se preparan como sigue:

25 Un cultivo de una noche de MB-2985 desarrollado en

1 un medio de infusión de cerebro-corazón a 37°C con agita-
ción, se diluye 20.000 veces y se deposita sobre la super-
ficie de 10 ml de agar de infusión de cerebro-corazón con-
tenidos en una placa petri de 85 mm de diámetro. Sobre las
5 placas se colocan unos discos de 0,5" (12,7 mm) de diáme-
tro conteniendo 100 µl de solución de antibiótico y después
se incuban durante 18 horas a 37°C. Las zonas de inhibición
se leen en mm.

EJEMPLO 2

10 Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado
de Streptomyces cattleya NRRL 8057 y el contenido se utili-
za para inocular un Erlenmeyer de siembra de 250 ml, pro-
visto de tabiques, que contiene 50 ml de Medio A con la si-
guiente composición:

Medio A

Autolizado de levadura (Ardamine [†])	10,0 g
Glucosa	10,0 g
Tampón de fosfato ⁺	2,0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
20 Agua destilada	1000 ml
pH ajustado a 6,5 con NaOH.	

[†] Ardamine: Yeast Products Corporation.

25

1 + Solución tampón de fosfato

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

5 Este matraz de siembra se sacude a 28°C en un sacudidor a 220 rpm (recorrido, 2", 5 cm) durante 2 días, al cabo de los cuales el crecimiento es satisfactorio.

10 Se inoculan 15 Erlenmeyers de 250 ml, conteniendo cada uno de ellos 40 ml de Medio B, con 1 ml por matraz del cultivo del matraz de siembra. El Medio B tiene la siguiente 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
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
20	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
	Poliglicol 2000 ^{***}	0,25% en volumen
	Agua destilada	1000 ml
	pH ajustado a 6,5 con NaOH	

25 ^{***} Poliglicol 2000: Dow Chemical Co.

1 Estos matraces se sacuden a 28°C en un sacudidor a
 220 rpm (recorrido, 2", 5 cm) durante 3 días, realizándose
 se los análisis durante el ciclo de fermentación. Los análisis
 se realizan sobre placas de ensayo normales de
 5 Staphylococcus aureus ATCC 6538P y Vibrio percolans ATCC
 8461, empleando discos de 0,5" (12,7 mm) sumergidos en el
 líquido que sobrenada en el caldo centrifugado. El pH de
 este caldo se ajusta antes del análisis como se indica en
 la siguiente tabla. Los resultados son los siguientes:

10	<u>Edad (horas)</u>	<u>48</u>	<u>53</u>	<u>72</u>
	Actividad sobre ATCC 6538P	33/39 t	31/38 t	21/27 t
	Actividad sobre ATCC 8461	35 lt/46 t	36 lt/44 t	33 lt/38 t
	pH inicial	5,2	5,1	4,8
15	pH ajustado	6,1	6,2	6,9
	lt = ligeramente turbio			
	t = turbio.			

20 Al cabo de las 53 horas, se reúnen los caldos y se
 filtran para dar 590 ml de filtrado a pH 5,9. El pH del
 filtrado se ajusta a 7,0 y se añaden 5,9 mg de ácido etil-
 endinitrilo-tetraacético (EDTA).

25 Se absorben 580 ml del filtrado anterior, a pH 7,0,
 sobre 130 ml de resina Dowex 1 x 2 en el ciclo de cloruro,
 recogiendo la corriente agotada en dos fracciones de
 290 ml. Después el adsorbato se lava con 130 ml de agua

1 desionizada. El adsorbato lavado se conserva en una cámara
fría durante la noche y después se eluye con solución al
5 % de NaCl, recogiendo 6 fracciones de 50 ml.

5 El porcentaje de recuperación de la bioactividad
inicial, determinado por el método de disco-placa, está
tabulado a continuación:

<u>Fracción</u>	<u>Vibrio percolans</u> <u>ATCC 8461</u>	<u>Staphylococcus aureus</u> <u>ATCC 6538P</u>
Fracciones 1 a 5 de eluato	26 %	1 %

10 El antibiótico N-acetiltienamicina se encuentra en
las fracciones 1 a 5 del eluato de NaCl. La fracción 4 se
analiza por el procedimiento de difusión en disco, emplean-
do discos de 0,5" (12,7 mm) de diámetro conteniendo 100 µl
de solución de antibiótico contra Staphylococcus aureus
15 MB-2985 y da una zona de 29 mm de diámetro. Las placas que
contienen MB-2985 se preparan por el procedimiento indica-
do en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 3

20 Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofiliza-
do de Streptomyces cattleya NRRL 8057 y el contenido se
suspende en 0,8 ml. de sales Davis estériles con la siguien-
te composición:

25

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

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

10

Medio A

Autolizado de levadura (Ardamine ^A)	10,0 g
Glucosa	10,0 g
Tampón de fosfato ⁺	2,0 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
Agua destilada	1000 ml
pH ajustado a 6,5 con NaOH	

15

^A Ardamine: Yeast Products Corporation.

⁺Solución tampón 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

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

1

Se transfieren asépticamente 10 ml de Medio A (sin agar) a uno de estos tubos inclinados, se rascan de las paredes las esporas y el micelio aéreo para pasarlos a suspensión y se utilizan 1,2 ml de esta suspensión para inocular tres Erlenmeyers de 2 litros, provistos de tabiques, que contienen 500 ml de Medio A (sin agar). Estos matraces de siembra se sacuden a 28°C en un sacudidor a 160 rpm durante 24 horas, al cabo de las cuales el crecimiento es satisfactorio.

5

10

El cultivo de estos matraces de siembra se reúne y se utiliza para inocular un fermentador de acero inoxidable de 756 litros, que contiene 467 litros de Medio A (sin agar).

15

Este tanque se hace funcionar a 28°C empleando una velocidad de agitación de 130 rpm y un caudal de aire de 10 pies³/minuto (283 dm³/minuto) durante 24 horas. Se utiliza el antiespumante Poliglicol 2000 (Dow Chemical Corp.) en la cantidad necesaria pero sin pasar de 0,1 %. Las determinaciones del pH se realizan como sigue:

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

20

Se utilizan 454 litros del cultivo de este tanque de siembra para inocular un fermentador de acero inoxidable de 5670 litros que contiene 4082 litros de Medio E, de la siguiente composición:

25

1

MEDIO E

	Cereciosa	25,0 g
	Licor de infusión de maíz (en mo- jado)	15,0 g
	Solubles de destilería	10,0 g
5	Medio de semilla de algodón (Phar- mamedia)	5,0 g
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01 g
	CaCO ₃ (después de ajustar el pH)	3,0 g
	Poliglicol 2000	0,25 %
10	Agua corriente	1000 ml

pH ajustado a 7,3 con NaOH.

Este tanque se opera a 24°C utilizando una velocidad de agitación de 70 rpm y un caudal de aire de 54,3 pies³ (1536,7 dm³) por minuto, durante 138 horas. Se añade anti-espumante adicional, Poliglicol 2000 en la medida necesaria pero sin pasar de 0,1 %. Se realizan los análisis antibacte-
rianos obteniéndose los siguientes resultados:

	<u>Edad</u>	<u>pH</u>	<u>ATCC nº 6633 (disco de 3/8", 9,5 mm) (mm)</u>
20	0	6,9	0
	24	6,3	0
	36	6,0	0
	48	5,9	0
	60	6,0	23
25	72	5,9	-

	<u>Edad</u>	<u>pH</u>	<u>ATCC-nº 6633 (disco de 3/8", 9,5 mm) (mm)</u>
1	84	6,0	21
	96	6,2	-
5	108	6,5	35
	120	6,6	36
	132	6,7	41
	138	6,7	39

10 Se filtran los 4082 litros de caldo de fermentación empleando un filtro-prensa de 30" (76 cm) y una mezcla auxiliar de filtración en la proporción de 4 % en peso/volumen. Se añaden al filtrado 46 g de sal sódica de ácido etilendinitrilo-tetraacético (EDTA). El filtrado se enfría a 6°C, se ajusta a pH 4,5 ± 0,2 y se mantiene a 6°C. El filtrado, frío se aplica a una columna de 480 litros de Dowex 15 50 x 4, Na⁺, 20-50 mallas, a unos 48 litros/minuto. Después de que ha pasado un frente de 1400 litros, se recogen 18,9 litros de efluente agotado, se ajusta el pH del efluente a 7,08 con NaOH y se conserva a 5°C.

20 Se prepara una columna de 3,8 cm de diámetro, rellena con 300 ml de resina Dowex 1 x 2, 50-100 mallas, en el ciclo de cloruro y se lava con 600 ml de agua desionizada a 5°C. Se pasan a través de la columna 4 litros del líquido agotado frío de la columna de Dowex 50 x 4, a un caudal de 30 ml/minuto. La columna se lava con 300 ml de EDTA 25 25 μM. El antibiótico N-acetiltienamicina se eluye a 5°C

1 a un caudal de 15 ml/minuto con 900 ml. de una solución de
NaCl al 5 % que contiene tampón de fosfato potásico 0,01 M,
pH 7,0, y EDTA 25 μ M. Se recogen 14 fracciones de 75 ml y
se analiza su actividad biológica por el procedimiento de di-
5 fusión en disco. Las fracciones 3 a 9 de eluato, con un volu-
men de 525 ml se reúnen y concentran a vacío hasta 115 ml.
El concentrado contiene 65 % del material bioactivo total
aplicado a la columna de Dowex 1 x 2 Cl⁻.

10 El concentrado del eluato de la columna de Dowex
1 x 2 Cl⁻ se aplica a 5°C a una columna de 3,8 cm de diáme-
tro rellena con 450 ml de XAD-2 prelavada. La resina XAD-2
es prelavada en columna sucesivamente con cuatro volúmenes
de la columna de: 1) EDTA 0,001 M, 2) NaOH 1 N, 3) agua des-
ionizada, 4) HCl 1 N, 5) agua desionizada, 6) metanol,
15 7) acetona, 8) agua desionizada y, antes de su uso, con
2250 ml de solución de NaCl al 5 % conteniendo EDTA, 25 μ M.

Después la muestra se aplica a la columna y a conti-
nuación se utilizan dos porciones de 25 ml de agua. La co-
luna se desarrolla a 5°C con agua desionizada, a un caudal
20 de 10 ml/minuto. La primera fracción contiene 400 ml y se
recogen 11 fracciones adicionales de 75 ml. El pH de cada
fracción se ajusta entre 6,9 y 7,13 con NaOH 1 N o HCl 1 N.
Se combinan las fracciones 3 a 9, que contienen el 46 % del
material bioactivo total aplicado a la columna de XAD-2 y
25 tienen un volumen total de 490 ml. Se toma una muestra de

1 45 ml para los bioanálisis por el procedimiento normalizado de difusión en disco frente a Staphylococcus aureus ATCC 6538P. Los 445 ml restantes se concentran a vacío hasta 50 ml.

5 Los 50 ml de concentrado del eluato de la columna de XAD-2 se bombean a 5°C sobre una columna de 1,5 cm rellena con 40 ml de Dowex 1 x 4 Cl⁻ prelavada, menos 400, a 5°C, a un caudal de 1 ml/minuto. La resina Dowex 1 x 4 Cl⁻, menos 400 (definida por decantación de agua), se lava en columna antes de su empleo con 240 ml de NaCl 0,2 M conteniendo 10 NH₄Cl 0,005 M y NH₄OH 0,1 mM a un caudal de 1 ml/minuto y después con 120 ml de agua desionizada al mismo caudal.

15 Después la muestra se aplica a la columna y a continuación se aplican dos porciones de 5 ml de agua desionizada. La columna se desarrolla a 5°C a un caudal de 0,92 ml/minuto con NaCl 0,07 M conteniendo NH₄Cl 0,005 M y NH₄OH 0,1 mM. Se recogen fracciones de 8,6 a 9,3 ml. Se reúnen las fracciones obtenidas después de haber recogido 600 ml de eluato, que terminan con 710 ml y contienen el 98 % del material bioactivo total aplicado a la columna de Dowex 1 x 4. 20 Esta mezcla se concentra a vacío hasta 2 ml.

25 El concentrado de la columna de Dowex 1 x 4 se aplica a una columna de 2,2 cm de diámetro rellena con 225 ml de Bio-Gel P-2, 200-400 mallas, con un límite de exclusión de 1300 Daltons (definido antes del uso por decantación en

1 agua destilada).

La columna de Bio-Gel P-2 se lava antes de su uso con 225 ml de NaCl 1 M seguidos de 100 ml de agua desionizada. La columna se desarrolla con agua desionizada a 5°C a un caudal de 1 ml/minuto y se recogen fracciones de 2 ml. Se combinan las fracciones desde 104 ml a 128 ml de eluato, que contienen el 83 % de la bioactividad aplicada a la columna de Bio-Gel P-2 y se concentran hasta 1,58 ml.

Se prepara una columna de 50 ml de XAD-2 (1,6 x 27 cm) y se prelava en columna con 200 ml de EDTA 1 mM, NaOH 1 N, agua desionizada, HCl 1 N, agua desionizada, metanol, acetona y agua desionizada. El concentrado de la columna de Bio-Gel P-2, conteniendo 44,4 unidades de densidad óptica extingible por hidroxilamina, se aplica a la columna de XAD-2 a 5°C seguido de dos porciones de 2 ml de agua desionizada. La columna se lava con agua desionizada a un caudal de 1 ml/minuto hasta que la absorbancia UV a 300 nm de las aguas de lavado se reduce a 0,060. La columna se eluye con metanol al 50 % en agua desionizada a un caudal de 1 ml/minuto y se recogen fracciones de 1 ml. Se combinan las fracciones con una absorbancia a 300 nm superior a 0,1 y se concentran a vacío para dar el producto, N-acetiltienamicina que contiene 11,6 unidades de densidad óptica extingibles por hidroxilamina.

EJEMPLO 4

Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado de Streptomyces cattleya NRRL 8057 y el contenido se suspende en 0,8 ml de sales Davis estériles con la siguiente composición:

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

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

Medio A

Autolizado de levadura (Ardamine [†])	10,0 g
Glucosa	10,0 g
Tampón de fosfato [†]	2,0 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
Agua destilada	1000 ml
pH ajustado a 6,5 con NaOH	

[†] Ardamine: Yeast Products Corporation.

1

+ Solución tampón de fosfato

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

5

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

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

10

Se transfieren asépticamente 10 ml de Medio A a uno de estos tubos inclinados, se rascan las paredes para pasar a suspensión las esporas y el micelio aéreo y se emplean 1,2 ml de esta suspensión para inocular tres Erlenmeyers de 2 litros, provistos de tabiques, que contienen 500 ml de Medio A (sin agar). Estos matraces de siembra se sacuden a 28°C en un sacudidor a 160 rpm durante 24 horas, al cabo de las cuales el crecimiento es satisfactorio.

15

Se reúne el cultivo de estos matraces de siembra y se utiliza para inocular un fermentador de acero inoxidable de 756 litros que contiene 467 litros de Medio A (sin agar). Este tanque se opera a 28°C empleando una velocidad de agitación de 130 rpm y un caudal de aire de 10 pies³ (283 dm³) por minuto durante 24 horas. Se utiliza el antiespumante Poliglicol 2000 (Dow Chemical Corp.) en la medida necesaria pero sin pasar de 0,1 %. Las determinaciones de pH se realizan como sigue:

25

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

Se emplean 454 litros del cultivo de este tanque de siembra para inocular un fermentador de acero inoxidable de 5670 litros que contiene 4082 litros de Medio E, de la siguiente composición:

		<u>Medio E</u>	
	Cerelesa	25,0	g
10	Licor de infusión de maíz (en mojado)	15,0	g
	Solubles de destilería	10,0	g
	Medio de semilla de algodón (Pharmamedia)	5,0	g
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01	g
	CaCO ₃ (después de ajustar el pH)	3,0	g
15	Poliglicol 2000	0,25	%
	Agua corriente	1000	ml
	pH ajustado a 7,3 con NaOH.		

Este tanque se hace funcionar a 24°C empleando una velocidad de agitación de 70 rpm y un caudal de aire de 54,3 pies³ (1536,7 dm³) por minuto, durante 138 horas. Se añade antiespumante adicional Poliglicol 2000 en la medida necesaria pero sin pasar del 0,1 %. Se realizan los análisis antibacterianos con los siguientes resultados:

25

	<u>Edad</u>	<u>pH</u>	<u>ATCC nº 6633 (disco de 3/8", 9,5 mm) (mm)</u>
1	0	6,9	0
	24	6,3	0
	36	6,0	0
5	48	5,9	0
	60	6,0	23
	72	5,9	-
	84	6,0	21
	96	6,2	-
10	108	6,5	35
	120	6,6	36
	132	6,7	41
	138	6,7	39

15 Se filtran los 4082 litros del caldo de fermentación empleando un filtro-prensa de 30" (76 cm) y una mezcla auxiliar de filtración en una proporción del 4 % en peso/volumen. Se añaden al filtrado 46 g de la sal sódica del ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA). El filtrado se enfría a

20 6°C, se ajusta a pH $4,5 \pm 0,2$ y se mantiene a 6°C. Se aplica el filtrado frío a una columna de 480 litros de Dowex 50 x 4 Na⁺, 20-50 mallas, a unos 48 litros/minuto. Después de que ha pasado un frente de 1400 litros, se recogen 18,9 litros del líquido agotado, se ajusta su pH a 7,08 con NaOH

25 y se conserva a 5°C.

1 Se prepara una columna de 3,8 cm de diámetro rellena
con 300 ml de resina Dowex 1 x 2, 50-100 mallas, en el ciclo de cloruro y se lava con 300 ml de agua desionizada a 5°C. Se pasan 4 litros del líquido agotado frío de la columna Dowex 50 x 4 a través de la columna preparada en último lugar a una velocidad de 30 ml/minuto. La columna se lava con 350 ml de EDTA 25 µM y después se eluye a 5°C con 900 ml de una solución de NaCl al 5 % conteniendo Tris.HCl 0,01 M, pH 7, y EDTA 25 µM, a un caudal de 15 ml/minuto.
5
10 Se recogen fracciones de 75 ml y se analizan por el procedimiento de difusión en disco frente a Staphylococcus aureus ATCC 6538P. Se añaden las fracciones 4 a 10, que contienen el 47 % de la bioactividad aplicada, a 42,5 ml de la muestra tomada para bioanálisis de la primera mezcla procedente de la columna de XAD-2 descrita en el Ejemplo 3. Estas fracciones combinadas se concentran a vacío hasta 100 ml y se ajusta el pH a 6,32 con HCl.

15
20 Una columna de 3,8 cm de diámetro, rellena con 450 ml de resina XAD-2, se lava previamente en la columna, sucesivamente, con cuatro volúmenes de la columna de: 1) EDTA 0,001 M, 2) NaOH 1 N, 3) agua desionizada, 4) HCl 1 N, 5) agua desionizada, 6) metanol, 7) acetona, 8) agua desionizada y antes de su uso se lava con 2250 ml de una solución de NaCl al 5 % conteniendo EDTA 25 µM. El concentrado anterior se aplica a una columna de XAD-2, seguido
25

1 de la aplicación de dos porciones de 5 ml de agua desioniza-
da. La columna se desarrolla a 5°C a un caudal de 10 ml/mi-
nuto con agua desionizada. La primera fracción contiene
40 ml y se recogen las fracciones de 75 ml subsiguientes y
5 se analizan por el procedimiento de difusión en disco. Se
reunen las fracciones 9 a 15 que contienen el 22 % de la bio-
actividad aplicada a la columna de XAD-2 y se concentran a
vacío hasta 56 ml.

10 Una columna de 21 x 1,7 cm, rellena con 40 ml de
Dowex 1 x 4 Cl⁻, menos 400 mallas (definida por decantación
en agua), se lava en columna antes de su uso con 240 ml de
NaCl 0,2 M conteniendo NH₄Cl 0,005 M y NH₄OH 0,1 mM, a un
caudal de 1 ml/minuto y después con 120 ml de agua desioni-
zada al mismo caudal.

15 El concentrado de la columna de XAD-2 se aplica a esta
última columna seguido de dos porciones de 2 ml de agua
desionizada y después de dos porciones de 2 ml de tampón elu-
yente. La columna se eluye a 5°C con una solución de NaCl
0,07 M conteniendo NH₄Cl 0,005 M y NH₄OH 0,1 mM, a un caudal
20 de 1 ml/minuto. Se recogen fracciones de 10 ml que se anali-
zan por el método de difusión en disco. Las fracciones de
eluatado desde 544 ml a 647 ml, que contienen aparentemente el
100 % de la bioactividad aplicada, se combinan y concentran
a vacío hasta 2,3 ml. El concentrado contiene 36,4 unidades
25 de densidad óptica extingüibles por hidroxilamina.

1 Una columna de 2,2 x 62 cm, rellena con 225 ml de re-
sina Bio-Gel P-2, 200-400 mallas, con un límite de exclu-
sión de 1800 Daltons, se lava antes de su uso con 225 ml de
NaCl 1 M seguidos de 100 ml de agua desionizada. Se aplica a
5 la columna el concentrado de la columna de Dowex 1 x 4, se-
guido de dos porciones de 2 ml de agua desionizada. La colum-
na se desarrolla a 5°C con agua desionizada a un caudal de
1 ml/minuto y se recogen fracciones de 2 ml que se analizan
por el procedimiento de difusión en disco. Se combinan las
10 fracciones desde 124 ml a 129 ml, que contienen 7,04 unida-
des de densidad extingüibles por hidroxilamina, y se concen-
tran a vacío hasta 2 ml para dar una solución acuosa del pro-
ducto, N-acetiltienamicina. Se combinan las fracciones de
117 a 123 ml y de 130 a 139 ml para dar una solución del pro-
15 ducto, N-acetiltienamicina, conteniendo 13,7 unidades de den-
sidad óptica extingüible por hidroxilamina.

EJEMPLO 5

Preparación de tienamicina

20 Se abre asépticamente un tubo de un cultivo liofiliza-
do de Streptomyces cattleya NRRL 8057 y el contenido se sus-
pende en 50 ml de Medio A estéril contenido en un Erlenmeyer
de 250 ml provisto de tabiques. El Medio A tiene la siguien-
te composición:

25

1

Medio A

5

Autolizado de levadura (Ardamine [*])	10,0 g
Glucosa	10,0 g
Tampón de fosfato ⁺	2,0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Agua destilada	1000 ml
pH ajustado a 6,5 con NaOH	

* Ardamine: Yeast Products Corporation

⁺ Solución tampón de fosfato

10

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
Agua destilada	1000 ml

15

El matraz inoculado se sacude a 28°C a 220 rpm (recorrido, 2", 5 cm), durante 48 horas. Se separan asépticamente 40 ml del caldo de 48 horas y se mezclan con 40 ml de glicerol acuoso estéril al 20 % (en volumen). Se pipetea 2 ml de la mezcla resultante en viales estériles de un dracma que después se congelan y conservan en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido.

20

Se utiliza el contenido de los viales congelados 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 y 28°C durante 24 horas.

25

Se utilizan porciones de 10 ml de este matraz de siem-

1 bra para inocular Erlenmeyers de 2 litros provistos de ta-
biques que contienen 500 ml. de Medio A. Estos matraces de
siembra se sacuden en un sacudidor a 160 rpm y 28°C, duran-
te 24 horas.

5 Se utilizan 1000 ml de los contenidos reunidos de es-
tos matraces de siembra para inocular un fermentador de ace-
ro inoxidable de 756 litros que contiene 467 litros de Me-
dio A. Este tanque es operado a 28°C empleando una veloci-
dad de agitación de 130 rpm y un caudal de aire de 10 pies³
10 (283 dm³) por minuto, durante 24 horas. Se utiliza Poligli-
col 2000 (Dow Chemical Corp.) como antiespumante en la me-
dida necesaria pero sin pasar del 0,1 %. Se realizan medi-
das del pH y de la dextrosa con los siguientes resultados:

15

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

Se emplean 453 litros de este cultivo para inocular
un fermentador de acero inoxidable de 5670 litros que con-
tiene 4082 litros de Medio E de la siguiente composición:

20

<u>Medio E</u>	
Cerelesa	25,0 g
Licor de infusión de maíz (en mojado)	15,0 g
Solubles de destilería	10,0 g
25 Medio de semilla de algodón (Pharma- media)	5,0 g

1	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01 g
	CaCO ₃ (después de ajustar el pH)	3,0 g
	Polyglicol 2000	0,25 %
5	Agua corriente	1000 ml
	pH ajustado a 7,3 con NaOH.	

Este tanque se opera a 24°C con una velocidad de agitación de 70 rpm y un caudal de aire de 54,3 pies³ (1536,7 dm³) por minuto, durante 144 horas. Se añade el antiespumante Poliglicol 2000 en la medida necesaria pero sin pasar de 0,1 %. El caldo centrifugado se analiza frente a Staphylococcus aureus ATCC 6538P por el procedimiento normalizado de difusión en disco. Los resultados se encuentran en la siguiente tabla bajo el encabezamiento "Actividad antibiótica frente a ATCC 6538P". También se realizaron análisis por el procedimiento de difusión en disco empleando discos de papel de filtro de 3/8" (9,5 mm) y placas de ensayo de 10 ml y los resultados están tabulados bajo el encabezamiento "Actividad antibiótica (placas de 10 ml)".

Las placas de ensayo de 10 ml se preparan como sigue: Un cultivo de una noche del organismo de ensayo, Staphylococcus aureus ATCC 6538P, en caldo nutritivo más 0,2 % de extracto de levadura, se diluye con caldo nutritivo más 0,2 % de extracto de levadura hasta formar una suspensión con una transmitancia del 40 % a una longitud de onda de 660 m^μ. Es-

1 ta suspensión se agrega a un agar nutritivo 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
 5 suspensión por litro de agar. Después se vierten 10 ml de
 esta suspensión en placas petri de 85 mm de diámetro y las
 placas se enfrían y se mantienen a 4°C hasta que se utili-
 zan (5 días como máximo).

	Edad	pH	Dextrosa mg/ml	Actividad anti- biótica frente a ATCC 6538P (mm)	Actividad antibió- tica (placas de 10 ml) (mm)
10	0	6,6	22,2		
	12	6,3	20,2		
	24	5,8	18,0		0
	36	6,0	13,2		21,5
	48	6,0	8,6		21,5
15	60	5,7	6,4		26,5
	72	5,8	2,7		25,5
	84	6,2	0,3		27,5
	96	6,4	0,2		36,0
20	108	6,4	0		35,0
	120	6,3		41,5	37,0
	132	5,8			37,5
	144	5,9		43,0	37,5

25 Se filtran los 4082 litros de caldo de fermentación
 empleando un filtro-prensa de 30" (76 cm) y una mezcla au-

1 xiliar de filtración en la proporción del 4 % en peso/volumen. Se añaden al filtrado 12 g de la sal sódica del ácido (etilendinitrilo)tetraacético. Se enfría el filtrado a 6°C, se ajusta a pH 4,5 ± 0,2 y se mantiene a 6°C. El filtrado
5 frío se adsorbe en 480 litros de Dowex 50 x 4 Na⁺, 20-50 mallas, a unos 48 litros/minuto. El adsorbato se lava con 480 litros de agua desionizada y después se eluye con solución acuosa de piridina al 2 % a razón de 24 litros/minuto y se recogen tres fracciones de 300 litros, 520 litros y
10 240 litros, que se analizan a pH 7,0. Los análisis indican que las fracciones de eluato contienen 4 %, 16 % y 6 % respectivamente de la bioactividad aplicada a la columna de Dowex 50 x 4 Na⁺. La fracción de eluato 2 se concentra a 48 litros y se ajusta a pH 7.

15 Los 48 litros de concentrado se ajustan a pH 7,3 y se adsorben en 76 litros de resina Dowex 1 x 2, 50-100 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
20 y una de 48 litros. Las fracciones se ajustan a pH 7 a medida que son recogidas. Los análisis indican que el 68 % de la bioactividad de partida se encuentra en la fracción de 70 litros. Esta fracción se concentra hasta 18 litros a pH 7,0 y se filtra empleando un filtro Millipore de
25 0,45 micras. El filtrado se liofiliza en bandejas para dar

1 99 g de producto con una potencia de 310 unidades/mg , don
de una unidad está definida como la cantidad que se calcu
la que produce la misma inhibición contra Staphylococcus
5 aureus ATCC 6538P, empleando el procedimiento de difusión
en disco, que 1 µg de cefalotina/ml, teniendo esa zona de
inhibición un diámetro comprendido entre 16 y 21 mm.

Se recogen 10 g del sólido liofilizado en solución
tampón de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M, pH 6,3. La solu
ción, cuyo volumen es de 125 ml, se reajusta a pH 6,3 con
10 ácido acético, se aplica a una columna de Dowex 50 x 8
(200-400 mallas) en el ciclo de 2,6-lutidina, de 7,6 x 142
cm, que ha sido previamente equilibrada con solución tampón
y se desarrolla con tampón 0,1 M a razón de 25 ml/minuto.
Se recoge un frente de 3 litros seguido de 200 fracciones
15 de 20 ml cada una. Cada cuarta fracción 36 a 192 se analiza
a una dilución de 1:200. La bioactividad se encuentra en
las fracciones 56 a 192, alcanzando un máximo en las frac
ciones 92 a 96. Se combinan las fracciones 80 a 136 y se
añaden 590 ml de agua desionizada para dar 1760 ml. La so
20 lución diluída reunida, conteniendo 62 % de la bioactividad
inicial aplicada a la columna de Dowex 50 x 8, se liofiliza.

El sólido liofilizado se disuelve en solución tampón
de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M, pH 7,0. Se aplican 27 ml
de la solución a una columna de Bio-Gel P-2, (200-400 ma
25 llas), de 5 x 112 cm, que ha sido previamente equilibrada

1 con tampón 0,1 M. Después se desarrolla el gel con el mismo
tampón a 10 ml/minuto.

5 La corriente efluente se estudia con un refractómetro
diferencial registrador Meccomatic. El desarrollo se prosi-
gue hasta que se han recogido 105 fracciones de 20 ml cada
una. Cada fracción 70 a 93 se analiza a una dilución de 1:300.
La bioactividad se encuentra en las fracciones 73 a 82, alcan-
zando un máximo en las fracciones 77 y 78. Las fracciones 75
a 80 se liofilizan para obtener 90 mg de antibiótico con una
10 potencia media de 10.000 unidades/mg.

15 Los 90 mg de sólido liofilizado se recogen en 4 ml de
tampón de fosfato potásico 0,01 M, pH 7. Esta solución, que
contiene 596 unidades de densidad óptica extingüible por
hidroxilamina (esta medida del contenido de tienamicina ha
sido descrita en la sección titulada Análisis), se aplica a
una columna de 1,7 cm de diámetro rellena con 90 ml de
XAD-2 prelavada y se equilibra antes de su uso con 180 ml
de tampón de fosfato potásico 0,01 M, pH 7, a 5°C. La resina
XAD-2 se lava antes de su uso sucesivamente con: 1) 5 volúme-
20 nes 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) 5 volú-
menes de metanol, acetona, EDTA tetrasódico 0,001 M y final-
mente agua destilada. Se aplica vacío a todos los disolven-
25 tes antes del uso.

1. Después la mezcla se aplica a la columna, seguido de dos porciones de 2 ml del tampón de fosfato. La columna se desarrolla a 5°C con el tampón a un caudal de 2 ml/minuto. Se recogen fracciones de 4 ml del eluato. Las fracciones obtenidas después de haber recogido 100 ml de 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.

10 Esta solución, que contiene 436 unidades de densidad óptica extingüible por hidroxilamina, se aplica a una columna de 1,7 cm de diámetro rellena con 90 ml de resina XAD-2 prelavada como antes y equilibrada a 5°C con agua destilada. La muestra va seguida de dos porciones de 2 ml de agua destilada. La columna se desarrolla con agua destilada a un caudal de 2 ml/minuto. Se recogen fracciones de eluato de 4 ml. Las fracciones obtenidas después de haber recogido 100 ml de eluato y terminando con 151 ml se reúnen y concentran en un evaporador rotatorio hasta un volumen de 2,73 ml y la solución se liofiliza para dar 6,49 mg de tienamicina. Se reúnen las fracciones obtenidas entre 152 y 345 ml y se concentran en un evaporador rotatorio hasta un volumen de 3,34 ml y después se liofilizan para dar 11,53 mg de tienamicina. Estas fracciones contienen un total de 369 unidades de densidad óptica extingüibles por hidroxilamina. Esto representa una purificación de 3,1 veces sobre el material aplicado a la prime-

15

20

25

1 ra columna de XAD-2 y da una potencia calculada de 31.000 unidades/mg. El análisis espectrofotométrico de una muestra de este producto da un $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 253$, cuando se mide en tampón de fosfato, pH 7, a 297 nm.

5 Se recogen 10 g de los 99 g de sólido liofilizado obtenidos por purificación en Dowex 1 x 2 en tampón de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M, pH 6,3. La solución, cuyo volumen es de 125 ml, se reajusta a pH 6,3 con ácido acético y se aplica a una columna de Dowex 50 x 8 en el ciclo de 2,6-lutidina,
10 de 7,6 x 142 cm, que ha sido previamente equilibrada con tampón. La columna se desarrolla con tampón 0,1 M a 35 ml/minuto. Se recoge un frente de 3,6 litros seguido de 200 fracciones de 20 ml cada una. Cada cuarta fracción desde la 6 a la 194 se analiza a una dilución de 1:200. La bioactividad se
15 encuentra en las fracciones 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 un volumen de 1920 ml. La solución diluida reunida que contiene 63 % de la bioactividad aplicada a la columna de Dowex 50 x 8, se
20 liofiliza.

El sólido liofilizado se disuelve en tampón de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M, pH 7,0. Se aplican 25 ml de la solución a una columna de 5 x 112 cm de Bio-Gel P-2 (200-400 mallas), que ha sido previamente equilibrada con tampón 0,1 M.
25 Después se desarrolla el gel con el mismo tampón a 10 ml/mi-

1 nuto.

La corriente efluente se estudia con un refractómetro diferencial registrador Meccomatic. El desarrollo se prosigue hasta que se han recogido 125 fracciones de 20 ml cada una. Se analiza cada fracción 70 a 89 a una dilución de 1:300. La bioactividad se encuentra en las fracciones 72 a 81, alcanzando un máximo en la fracción 77. Se liofilizan las fracciones 75 a 79 para obtener 100,5 mg de antibiótico con una potencia de 8320 unidades/mg.

10 Se recogen los 100,5 mg de sólido liofilizado en 4 ml de tampón de fosfato potásico 0,01 M, pH 7. Esta solución, que contiene 692 unidades ópticas extingüibles por hidroxilamina, se aplica a una columna de 1,7 cm de diámetro rellena con 90 ml de resina XAD-2 prelavada y equilibrada antes de su uso con 180 ml de tampón de fosfato potásico 0,01 M, 15 pH 7, a 5°C. La resina XAD-2 se lava antes de su uso 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 20 efluente es neutro; 3) cinco volúmenes de metanol, acetona, EDTA tetrasódico 0,001 M y finalmente agua destilada. Antes de su uso se aplica vacío a todos los disolventes.

25 Después la mezcla se aplica a la columna seguido de dos porciones de 2 ml de tampón de fosfato. La columna se desarrolla a 5°C con el tampón a un caudal de 2 ml/minuto.

1 Se recogen fracciones de 4 ml de eluato. Se combinan las
fracciones obtenidas después de haber recogido 109 ml de
eluato, terminando con 309 ml. A este eluato combinado se
añaden los 11,53 mg de antibiótico purificado con XAD-2 an-
5 tes obtenido, que contiene 186 unidades de densidad óptica
extinguible por hidroxilamina. El eluato combinado, junto
con el antibiótico agregado, se concentra a vacío en un eva-
porador rotatorio a una temperatura inferior a 10°C, hasta
un volumen de 7 ml.

10 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 prelavada
como antes y equilibrada a 5°C antes de su uso con agua des-
tilada. La muestra va seguida de dos porciones de 2 ml de
15 agua destilada. La columna se desarrolla con agua destilada
a un caudal de 2 ml/minuto. Se recogen fracciones de 4 ml de
eluato. Se reúnen las fracciones obtenidas después de haber
recogido 109 ml de eluato, terminando con 301 ml y se concen-
tran en un evaporador rotatorio a un volumen de 10,3 ml. Es-
20 ta solución, que contiene 589 unidades de densidad óptica ex-
tingible por hidroxilamina, se liofiliza para dar 23,6 mg
de antibiótico con una potencia calculada de 30.140 unida-
des/mg.

25 El antibiótico tienamicina así preparado es un sólido
blanco amorfo de consistencia fibrosa, una muestra del cual,

1 por exposición en un tubo capilar de vidrio a temperaturas
elevadas a una velocidad de 3°C por minuto, experimenta des-
composición sin intervención de una fase líquida en las si-
guientes etapas: El ablandamiento se produce a $130-140^{\circ}\text{C}$
5 con una contracción del volumen del sólido que prosigue has-
ta $170-174^{\circ}\text{C}$, dentro de cuyo intervalo el material amarillea;
se observa sinterización y una intensificación progresiva
del color hasta llegar a pardo rojizo en el intervalo de 180
a 200°C y finalmente se encuentra carbonización y trazas re-
10 residuales de sólido a 205°C .

Otra muestra de este material presenta por análisis es-
pectrofotométrico un pico de absorbancia a $296,5\text{ nm}$ con una
 $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 268,2$. El análisis elemental da los siguientes re-
sultados: 1) una pérdida de peso del $5,67\%$ por secado a la
15 temperatura ambiente durante 4 horas a vacío y 2) una compo-
sición de $47,68\%$ de carbono, $6,22\%$ de hidrógeno y $11,48\%$
de nitrógeno. Estos resultados concuerdan con la fórmula em-
pírica $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_{2}\text{O}_4\text{S} \cdot (\text{NH}_3)_{0,28}$, siendo la composición elemental
calculada correspondiente a esta fórmula empírica la siguien-
20 te: C = $47,68\%$; H = $6,13\%$; N = $11,52\%$; S = $11,57\%$ y
O = $23,1\%$. El análisis polarimétrico de una solución de
1 mg/ml de esta muestra en tampón de fosfato potásico 10 mM
muestra una rotación óptica específica $[\alpha]_D^{27^{\circ}\text{C}} + 80$. El es-
pectro infrarrojo de una suspensión de Nujol de esta muestra
25 revela picos de absorción característicos a 1765 cm^{-1} ,

1 1650-1550 cm^{-1} , 2800-2500 cm^{-1} y 3500-3100 cm^{-1} . Un espectro
RMN a 100 MHz de una muestra de este producto disuelta en
D₂O revela un doblete a δ 1,275, una pareja de dobletes a
5 δ 3,39 y multipletes a δ 3,15 y δ 4,20, siendo caracterís-
ticos estos picos de la tienamicina.

EJEMPLO 6

Acetilación de la tienamicina

Se agitan durante 10 minutos a 0°C 10,9 mg de tienami-
cina en 1 ml de dimetilformamida seca más 2 ml de anhídrido
10 acético recién preparado. La dimetilformamida y el anhídrido
acético se separan lavando repetidas veces (5 a 6 veces) con
25-40 ml cada vez de hexano y una última porción de hexano
después de la adición de 1 ml de éter etílico seco. La mues-
tra cruda de N-acetiltienamicina se disuelve en 20 ml de
15 agua desionizada que contiene 100 μmoles de base Tris {tri(hi-
droximetil)aminometano} y 35 μmoles de HCl. El pH después de
disolver la muestra es 7,9. La solución contiene 244 unida-
des de absorbancia a 298 nm y un disco de ensayo de 1/2"
(12,7 mm) conteniendo 0,1 ml de una dilución de 1000 veces
20 produce una zona de inhibición de 23 mm cuando se incuba so-
bre placas de ATCC 8461 a 25°C.

Esta muestra se aplica a una columna (dimensiones del
lecho: 1,3 cm x 14 cm) de Dowex-1 x 4 (Cl^-) menos 400 mallas.
La columna se lava con 10 ml de agua desionizada y el anti-
25 biótico, N-acetiltienamicina, se eluye con NaCl 0,07 M +

1 NH_4Cl 0,005 M + NH_3 0,0001 M en agua desionizada. Se recogen
fracciones de 5,1 ml a un caudal de 0,7 ml por minuto. El
pico principal de absorbancia UV a 298 nm aparece en las frac-
ciones 36 a 50, con un máximo en la fracción 40. Se combi-
5 nan las fracciones 38 a 46 que contienen un total de 107 uni-
dades de absorbancia a 298 nm. Las fracciones combinadas se
evaporan en un evaporador rotatorio a presión reducida hasta
2 ml y se añaden 5 μl de NaOH 1 M.

10 Este concentrado se aplica a una columna (dimensiones
del lecho: 2,2 x 80 cm) de Bio-Gel P-2, 200-400 mallas. La
muestra se lava con dos porciones de 1 ml de agua desioniza-
da y se eluye con agua desionizada a un caudal de 0,6 ml/mi-
nuto. Se recogen fracciones de 3,04 ml.

15 El pico principal de absorbancia UV a 300 nm aparece en
las fracciones 54 a 64, con un máximo en la fracción 60. Se
reunen las fracciones 59 a 62 que contienen 83,7 unidades
 A_{300} . Se toma como referencia una muestra equivalente a 2,2
unidades A_{300} y el resto se concentra hasta 1,5 ml y se lio-
filiza en un vial de vidrio de 14 ml para dar 3,9 mg de
20 N-acetiltienamicina.

λ_{max} 301 nm, $E_{\text{max}}/E_{\text{min}} = 4,45$, $E_{301}^{\%}$ en agua desio-
nizada = 208.

EJEMPLO 7

Acetilación de la tienamicina

25 Etapas A

Se agitan 9 mg de tienamicina durante 10 minutos a 0°C

1 en 1 ml de dimetilformamida seca más 2 ml de anhídrido acé-
tico recién preparado. La dimetilformamida y el anhídrido
acético se separan lavando repetidamente (5 a 6 veces) con
5 porciones de 25-40 ml de hexano y una última porción de he-
xano después de la adición de 1 ml de éter etílico seco. Se
añaden 10 ml de agua destilada fría conteniendo 50 μ l de ba-
se Tris 1 M y 50 μ l de Tris.HCl 1 M, pH 8. El pH de esta so-
lución es 7,8 y contiene un total de 102 unidades de densi-
dad óptica extingible por hidroxilamina. Se añaden 10 ml
10 de agua destilada fría y la solución se mantiene a 0°C.

Se prepara una columna de 1,7 cm de diámetro rellena
de 30 ml de resina Dowex 1 x 4 Cl⁻ (menos 400 mallas) y se
lava con 90 ml de cada una de las siguientes soluciones:
15 1) HCl 0,2 M, 2) solución de NaCl 0,5 N conteniendo HCl
0,01 M y 3) agua desionizada.

La muestra de 20 ml se aplica a la columna de Dowex
1 x 4 seguida de dos porciones de 2 ml de agua desionizada
y después dos porciones de 1 ml de tampón eluyente. La co-
luna se eluye con NaCl 0,07 M conteniendo NH₄Cl 0,005 M
20 y NH₄OH 0,1 mM. El caudal es de 4,3 ml/5 minutos y se reco-
gen fracciones de 4,3 ml. Se combinan las fracciones desde
555 ml a 594 ml y se conservan a 5°.

Etapa B

25 Se agitan 27 mg de tienamicina durante 10 minutos a
0°C en 2 ml de dimetilformamida seca más 4 ml de anhídrido

1 acético recién preparado. La dimetilformamida y el anhídrido
acético se separan lavando seis veces con 25-40 ml de hexa-
no y una última porción de hexano después de la adición de
2 ml de éter etílico seco. Se añaden 10 ml de agua destila-
5 da fría conteniendo 50 μ l de base Tris 1M y 50 μ l de Tris.HCl
1 M, pH 8 y el pH resultante es 6,85. La solución contiene
148 unidades de densidad óptica extingible por hidroxilami-
na.

10 Se retira el centímetro superior de la columna de Do-
wex 1 x 4 (menos 400 mallas) descrita en la Etapa A) y la
columna se lava con 90 ml de cada una de las siguientes so-
luciones: 1) HCl 0,2 M, 2) solución de NaCl 0,5 N contienien-
do HCl 0,01 M y 3) agua desionizada.

15 Se añaden 10 ml de la mezcla a 10 ml de agua destilada
a 0°C y se aplica a la columna de Dowex 1 x 4 Cl⁻ seguido
de dos porciones de 2 ml de agua desionizada y después dos
porciones de 2 ml de tampón eluyente. La columna se eluye
con una solución de NaCl 0,07 M que contiene NH₄Cl 0,005 M
y NH₄OH 0,1 mM. El caudal es de 4,3 ml/5 minutos y se reco-
20 gen fracciones de 4,3 ml. Se reúnen las fracciones desde
497 a 571 ml y se agregan a las fracciones reunidas de la co-
lumna de Dowex 1 x 4 descrita en la Etapa A. En conjunto,
estas fracciones contienen 117,5 unidades de densidad ópti-
ca extingible por hidroxilamina.

25 Se prepara una columna de 2,2 x 62 cm rellena con

1 225 ml de resina Bio-Gel P-2 (200-400 mallas), con un lími
te de exclusión de 2600 Daltons (definidos antes del uso
por decantación de agua destilada) y se lava con 50 ml de
NaCl 1 M seguido de 225 ml de agua desionizada. Los eluatos
5 combinados de Dowex 1 x 4 se concentran a vacío hasta 2,66
ml y se aplican a la columna de Bio-Gel P-2, seguido de dos
porciones de 2 ml de agua desionizada. La columna se desa-
rrolla con agua desionizada a un caudal de 1 ml/minuto y se
recogen fracciones de 2 ml. Se combinan las fracciones des-
de 190 ml hasta 204 ml y se concentran hasta 2,5 ml.

10 Una columna de 2,2 x 62 cm rellena con 225 ml de Bio-
Gel P-2, 200-400 mallas, con un límite de exclusión de 1800
Daltons (definido antes del uso por decantación de agua des-
tilada) se lava antes de utilizarla con 225 ml de NaCl 1 M
15 seguidos de 100 ml de agua desionizada.

Los 2,5 ml de concentrado anterior, conteniendo 109,5
unidades de densidad óptica extingible por hidroxilamina,
se aplican a la columna seguidos de dos porciones de 2 ml
de agua desionizada. La columna se desarrolla con agua
20 desionizada a un caudal de 1 ml/minuto y se recogen fraccio-
nes de 2 ml. Se combinan las fracciones de 104 a 132 ml que
contienen 97 unidades de densidad óptica extingible por
hidroxilamina. Se mantiene a 0°C una muestra de 2,4 ml para
los análisis in vitro y el resto se liofiliza para dar N-ace-
25 tilitienamicina.

1 Las composiciones que contienen el antibiótico N-acetiltienamicina pueden ser administradas en varias formas de dosis unitarias como, por ejemplo, en forma sólida o líquida ingerible por vía oral. Las composiciones por dosis unitaria, ya sean sólidas o líquidas, pueden contener de 0,1 a 5 99 % de material activo, siendo el intervalo preferido de 10 a 60 % aproximadamente. En general la composición contiene alrededor de 25 a 1000 mg del ingrediente activo, calculado sobre el peso total de la composición; sin embargo, 10 en general, es preferible emplear una dosis del orden de 250 a 1000 mg o preferiblemente de 400 a 800 mg aproximadamente. En la administración parenteral, la dosis unitaria es habitualmente el compuesto puro en una solución acuosa estéril ligeramente acidulada o en forma de polvo soluble 15 destinado a la disolución. Las formulaciones representativas pueden ser preparadas mediante los siguientes procedimientos:

<u>Cápsulas</u>	<u>Por cápsula</u>
N-acetiltienamicina	400 mg
Lactosa, U.S.P., cantidad suficiente	
20 para llenar cápsulas del nº 0, de aproximadamente 475 mg cada una.	

25 En el ejemplo anterior, se mezclan el compuesto activo y el diluyente para formar una mezcla uniforme que después se introducen en cápsulas de gelatina dura del nº 0, a mano o en una máquina adecuada, según sea necesario. Preferi

1 blemente la mezcla y el llenado se realizan en una zona con una humedad relativa inferior al 40 %.

	<u>Tabletas</u>	<u>Por tableta</u>
	N-acetiltienamicina	300,0 mg
5	Fosfato cálcico	192,0 mg
	Lactosa, U.S.P.	190,0 mg
	Almidón de maíz	80,0 mg
	Estearato magnésico	<u>8,0 mg</u>
		800,0 mg

10 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 de almidón de maíz al 15 %, se tamiza groseramente y se tamiza de nuevo a través de tamices del nº 16 de las normas estado-
15 unidenses. Se añade el resto del almidón de maíz y del estearato magnésico y la mezcla se comprime en tabletas, con un diámetro aproximado de 1/2" (12,7 mm), pesando cada una de ellas 800 mg.

20 Alternativamente, se mezcla el componente activo con el fosfato cálcico, la lactosa y la mitad del almidón de maíz. La mezcla se "aglomera" en una prensa de acción intensa para producir masas compactadas del tipo de tabletas. Estas se desintegran hasta formar gránulos del nº 16 de las normas estadounidenses. Se añaden el resto del almidón de
25 maíz y de estearato magnésico y la mezcla se comprime en ta-

1 bletas de un diámetro aproximado de 1/2" (12,7 mm), pesando 800 mg cada una de ellas.

<u>Forma liofilizada</u> <u>(para inyección)</u>	<u>Por vial</u>
5 N-acetiltienamicina	25 mg
Agua para inyección, U.S.P., c.s. hasta	5 ml

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

15 Para restaurar el producto para su administración parenteral, se añaden 5 ml de agua estéril para inyección al contenido de un vial.

<u>Formas líquidas orales</u>	<u>Por 1000 ml</u>
20 N-acetiltienamicina	1,0 g
Sacarosa	600,0 g
Glucosa	250,0 g
Benzoato sódico	1,0 g
Aceite de naranja concentrado	0,2 ml
Agua purificada, U.S.P., c.s. hasta	1000,0 ml

25 Se disuelven la sacarosa y la glucosa en unos 400 ml

1 de agua, empleando calor para favorecer la disolución. Se
enfria esta solución y se añade benzoato sódico seguido
del aceite de naranja concentrado. La solución se lleva a
un volumen de unos 900 ml con agua y se agrega el antibió-
5 tico. La solución se clarifica por filtración a través de
un filtro grosero.

En resumen la patente de invención que se solicita
deberá recaer en las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1. Un procedimiento para la producción de N-acetil
tienamicina que consiste en cultivar Streptomyces cattleya
en un medio nutritivo acuoso que contiene fuentes asimila-
bles de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condicio
nes aerobias sumergidas y recuperar la N-acetiltienamicina
15 así producida.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, don
de el microorganismo cultivado es Streptomyces cattleya
NRRL 8057.

20 Se reivindica por último como objeto sobre el que
ha de recaer la patente de invención que se solicita: UN
PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE N-ACETILTENAMICINA.

25

1

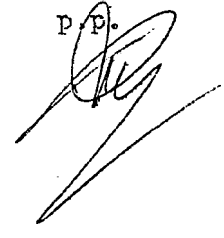
Tod conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de setenta y seis páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

5

Madrid, 19 Noviembre de 1976

BERNARDO UNGRIA

P.P.



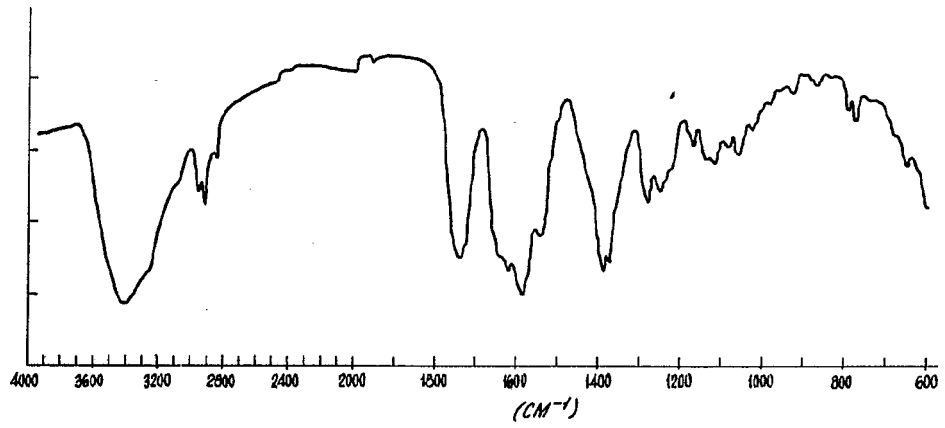
10

15

20

25

Fig. 1.



ESCALA VARIABLE
Madrid, 19 Noviembre 1976
BERNARDO UNGRIA
P.P.