



Concedido el Registro de acuerdo
con los datos que figuran en la pre-
sente descripción y según el con-
tenido de la Memoria adjunta.

20 JUL. 1978

PATENTE DE INVENCION

| | | |
|----------------------------|----------------|---------|
| (10) ES | (11) NUMERO | (12) A1 |
| | 458.070 | |
| (22) FECHA DE PRESENTACION | 21 abril 1.977 | |

| | | |
|----------------------------------|----------------|-----------------|
| (30) PRIORIDADES: (31) NUMERO | (32) FECHA | (33) PAIS |
| 680.831 | 28 abril 1.976 | Estados Unidos. |

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

| |
|---|
| (54) TITULO DE LA INVENCION |
| UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL COMPUESTO ANTI-BIOTICO MSD 890A. |

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

| |
|--|
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE |
| 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey, Estados Unidos. |

| |
|--|
| (72) INVENTOR (ES) |
| Patrick J. Cassidy, Robert T. Goegelman, Edward O. Stapley y Sebastián Hernández. |

| |
|-----------------------|
| (73) TITULAR (ES) |
| El mismo solicitante. |

| |
|------------------------------|
| (74) REPRESENTANTE |
| DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU. |

1

RESUMEN DE LA INVENCION

5

Los antibióticos MSD 890A₂ y MSD 890A₅ y sus sales farmacéuticamente aceptables (denominadas en lo que sigue antibióticos 890A₂ y 890A₅) son activos contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los antibióticos son producidos cultivando especies de Streptomyces sobre medios de fermentación adecuados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

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, cefalosporinas, estreptomycin, bacitracina, tetraciclinas, clo-ranfenicol, eritromicinas y similares. En general, la actividad antibacteriana de todos estos antibióticos no incluye ciertas bacterias patógenas clínicamente importantes. Por ejemplo, algunos son principalmente activos solamente contra los tipos Gram-positivos de bacterias. La resistencia adquirida a lo largo del extenso uso de los antibióticos existentes en el tratamiento de las infecciones bacterianas ha producido la aparición de un grave problema de resistencia.

15

20

En consecuencia, las deficiencias de los antibióticos conocidos han estimulado nuevas investigaciones para encontrar otros antibióticos que sean activos contra una gama más amplia de patógenos así como contra las cepas resistentes de microorganismos particulares.

25

30

Estas nuevas investigaciones han conducido al descubrimiento de la familia de antibióticos de la tienamicina de las que son miembros los compuestos de esta invención. Otros miembros de la familia de antibióticos de tienamicina están des-

1 criticos en las solicitudes de patentes estadounidenses número
de serie 632.938, presentada el 18 de Noviembre de 1975,
de Jean S. Kahan, Frederick M. Kahan, Edward O. Stapley, Robert
5 T. Goegelman y Sebastián Hernández, que es una solicitud
divisional de la solicitud copendiente de Jean S. Kahan,
Frederick M. Kahan, Edward O. Stapley, Robert T. Goegelman
y Sebastián Hernández, n° de serie 526.992, presentada el
25 de Noviembre de 1974; número de serie 613.822, de Robert
10 T. Goegelman y Frederick M. Kahan, presentada el 18 de Septiembre
de 1975, que es una continuación en parte de la solicitud
copendiente de Robert T. Goegelman y Frederick M.
Kahan, número de serie 534.382, presentada el 19 de Diciembre
15 de 1974 y ahora abandonada; número de serie 634.300 de
Patrick J. Cassidy, Robert T. Goegelman, Edward O. Estapley
y Sebastián Hernández, presentada el 21 de Noviembre de
1975; número de serie 634.301 de Jean S. Kahan, Frederick
M. Kahan, Robert T. Goegelman, Edward O. Stapley y Sebastián
20 Hernández, presentada el 21 de Noviembre de 1975 y número
de serie 634.560 de Jean S. Kahan y Frederick M. Kahan, presentada
el 24 de Noviembre de 1975.

COMPENDIO DE LA INVENCION

25 Esta invención se refiere a nuevos miembros de la familia
de agentes antibióticos de la tienamicina. Más especialmente,
se refiere a nuevas sustancias antibióticas, denominadas aquí
890A₂ y 890A₅. La invención comprende los antibióticos
en formas diluídas así como en concentrados crudos y
en formas puras.

30 Un objeto de esta invención es proporcionar nuevos y
útiles antibióticos que son muy eficaces para inhibir el crecimiento
de diversos microorganismos Gram-negativos y Gram-

1 positivos. Otro objeto es proporcionar un procedimiento para
la preparación de estas nuevas sustancias antibióticas por
fermentación de medios nutritivos con especies de Streptomyces.
5 Otros objetos resultarán evidentes en la descripción detalla
da de esta invención dada a continuación.

Las nuevas sustancias antibióticas de esta invención
son producidas cultivando en condiciones controladas nuevas
cepas de Streptomyces flavogriseus.

10 Basándose en extensos estudios taxonómicos, las cepas
de los microorganismos utilizados en esta invención fueron
identificadas como pertenecientes a la especie Streptomyces
flavogriseus y han sido denominadas MA-4434 y MA-4600 en la
colección de cultivos de Merck & Co., Inc, Rahway, N.J. Un
15 cultivo de cada una de ellas ha sido colocado en depósito
permanente sin restricciones en cuanto a su disponibilidad
en la colección de cultivos de los Northern Regional Labo-
ratories, Northern Utilization Research and Development Di-
vision, Agricultural Research Service, Departamento de Agri-
cultura de Estados Unidos, Peoria, Ill., y están a la dispo-
20 sición del público bajo el número de accesión NRRL 8139 y
8140, respectivamente.

Los microorganismos Streptomyces flavogriseus NRRL-
8139 y NRRL 8140 producen ambos los dos antibióticos 890A₂
25 y 890A₅ que son aislados en forma prácticamente pura del cal-
do de fermentación.

Las características morfológicas y de cultivo del
Streptomyces flavogriseus NRRL-8139 están indicadas en la si-
guiente tabla.

30 Morfología - Los esporóforos son cadenas de esporas ramifica-
das, entre lineales y flexuosas, que forman mechones. Las

1 cadenas tienen una longitud mayor de 10 esporas. Las esporas son de forma entre esférica y global - $0,9 \mu \times 1,2 \mu$ (970 x).

Características de cultivo

5 Agar harina de avena

Crecimiento vegetativo - reverso tostado amarillento, crecimiento en forma de parchas;

Micelio aéreo - gris claro bordeado de gris medio

Pigmento soluble - ninguno.

10 Agar Czapek Dox (agar sacarosa-nitrato)

Crecimiento vegetativo - reverso marrón bordeado de marrón oscuro;

Micelio aéreo - gris medio, aterciopelado;

Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio.

15 Agar albúmina de huevo

Crecimiento vegetativo - reverso tostado amarillento bordeado de marrón;

Micelio aéreo - gris medio mezclado con gris amarillento (2 dc) y amarillo grisáceo (2 db);

20 Pigmento soluble - tostado amarillento claro.

Agar glicerol-asparagina

Crecimiento vegetativo - reverso tostado amarillento, plano, extendido;

25 Micelio aéreo - aterciopelado, gris claro con un intenso tono amarillento a gris (2 dc);

Pigmento soluble - ninguno.

Agar sales inorgánicas-almidón

Crecimiento vegetativo - reverso marrón;

Micelio aéreo - gris medio, aterciopelado;

30 Pigmento soluble - tostado amarillento claro.

1

Agar extracto de levadura-dextrosa + sales

Crecimiento vegetativo - reverso marrón bordeado de marrón muy oscuro;

Micelio aéreo - gris oscuro mezclado con un gris claro, aterciopelado;

5

Pigmento soluble - ninguno.

Agar extracto de levadura-extracto de malta

Crecimiento vegetativo - reverso marrón oscuro;

Micelio aéreo - gris oscuro, aterciopelado

10

Pigmento soluble - ninguno.

Agar leche descremada

Crecimiento vegetativo - tostado;

Micelio aéreo - escaso, grisáceo;

Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio;

15

Hidrólisis de la caseína - buena.

Leche de tornasol

Crecimiento vegetativo - anillo de crecimiento moderado, tostado oscuro;

Micelio aéreo - ninguno;

20

Color - púrpura;

Coagulación y/o peptonización - peptonización completa;

volviéndose alcalino, pH 8,2.

Leche descremada

Crecimiento vegetativo - anillo de crecimiento moderado, tostado;

25

Micelio aéreo - ninguno;

Pigmento soluble - tostado;

Coagulación y/o peptonización - peptonización completa;

volviéndose alcalino, pH 8,0.

30

1

Agar tirosina

Crecimiento vegetativo - reverso marrón oscuro;
Micelio aéreo - gris oscuro;
Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio;
Descomposición de la tirosina - nula.

5

Agar peptona-hierro-extracto de levadura

Crecimiento vegetativo - tostado;
Micelio aéreo - escaso, grisáceo;
Pigmento soluble - ninguno;
Melanina - ninguna;
Producción de H₂S - nula.

10

Agar nutritivo

Crecimiento vegetativo - reverso marrón grisáceo claro bordeado de marrón grisáceo más oscuro;
Micelio aéreo - gris claro bordeado de gris oscuro;
Pigmento soluble - ninguno.

15

Agar almidón nutritivo

Crecimiento vegetativo - tostado bordeado de gris;
Micelio aéreo - gris medio bordeado de gris oscuro;
Pigmento soluble - ninguno;
Hidrólisis del almidón - buena.

20

Agar nutritivo gelatina

Crecimiento vegetativo - incoloro bordeado de gris oscuro;
Micelio aéreo - blanco grisáceo;
Pigmento soluble - ninguno;
Licuefacción de la gelatina - buena.

25

Trozo de patata

Crecimiento vegetativo - buen crecimiento, intensamente arrugado;
Micelio aéreo - gris a gris verdoso;

30

1 Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio.

Suero sanguíneo de Loeffler

Crecimiento vegetativo - color crema;

Micelio aéreo - ninguno;

5 Pigmento soluble - ninguno;

Licuefacción - nula.

Planchas de gelatina

Crecimiento vegetativo - color crema;

Micelio aéreo - ninguno;

10 Pigmento soluble - ninguno;

Licuefacción de la gelatina - buena.

15 Todas las lecturas indicadas en lo que antecede fueron tomadas al cabo de 3 semanas de incubación a 28°C, salvo indicación en contrario. El pH de los medios utilizados en estos estudios era aproximadamente neutro, es decir, 6,8-7,2. Las designaciones de color utilizadas en la descripción están de acuerdo con las definiciones del Color Harmony Manual, cuarta edición (1958), Container Corporation of America, Chicago, Illinois.

20 También se determinó la capacidad del Streptomyces flavogriseus NRRL 8139 para utilizar o asimilar diversos hidratos de carbono. Para este fin, el microorganismo fué cultivado en un medio sintético basal (Pridham y Gottlieb) conteniendo 1 % de hidrato de carbono a 28°C, durante 3 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 flavogriseus NRRL 8139, donde: + = buen crecimiento, † = mal crecimiento y - = crecimiento nulo sobre el hidrato de carbono particular.

25

30

1

TABLA I

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

5

10

El grado de crecimiento al variar la temperatura y el oxígeno requerido por el microorganismo es el siguiente:
 Temperaturas (agar extracto de levadura - dextrosa + sales)
 28°C = bueno
 37°C = buen crecimiento vegetativo; no hay hifas aéreas
 50°C = crecimiento nulo.

15

Oxígeno requerido (cultivo en lámina en agar extracto de levadura-dextrosa + sales):

Aerobio.

20

Las características morfológicas y de cultivo del Streptomyces flavogriseus NRRL 8140 están indicadas en la siguiente tabla.

25

Morfología - Los esporóforos son cadenas ramificadas, de lineales a flexuosas de esporas, formando mechones. Las cadenas tienen una longitud superior a 10 esporas. Las esporas son de forma esférica a oval - 0,9 μ x 1,2 μ (970 x)

25

Características de cultivo

Agar harina de avena

Crecimiento vegetativo - reverso tostado amarillento bordeado de marrón oscuro;

Micelio aéreo - gris claro bordeado de gris medio;

30

Pigmento soluble - ninguno.

1

Agar Czapek Dox (agar sacarosa-nitrato)

Crecimiento vegetativo - reverso marrón bordeado de marrón oscuro;

Micelio aéreo - gris medio, aterciopelado;

5

Pigmento soluble - ninguno.

Agar albúmina de huevo

Crecimiento vegetativo - reverso tostado grisáceo con secciones de intenso tostado amarillento;

Micelio aéreo - secciones de gris medio, blanco grisáceo y gris amarillento (2 dc);

10

Pigmento soluble - tostado muy claro.

Agar glicerol-asparagina

Crecimiento vegetativo - tostado amarillento;

Micelio aéreo - escaso, grisáceo;

15

Pigmento soluble - ninguno.

Agar sales inorgánicas - almidón

Crecimiento vegetativo - reverso crema grisáceo;

Micelio aéreo - gris medio, aterciopelado;

Pigmento soluble - ninguno.

20

Agar extracto de levadura-dextrosa + sales

Crecimiento vegetativo - reverso marrón oscuro;

Micelio aéreo - gris oscuro mezclado con gris claro, aterciopelado;

Pigmento soluble - ninguno.

25

Agar extracto de levadura-extracto de malta

Crecimiento vegetativo - reverso marrón oscuro;

Micelio aéreo - gris oscuro, aterciopelado;

Pigmento soluble - ninguno.

30

Agar peptona-hierro-extracto de levadura

Crecimiento vegetativo - tostado;

| | |
|----|--|
| 1 | Micelio aéreo - ninguno; Pigmento soluble - ninguno; Melanina - ninguna; Producción de H ₂ S - nula. |
| 5 | Agar nutritivo Crecimiento vegetativo - tostado claro; Micelio aéreo - ninguno; Pigmento soluble - ninguno. Agar almidón nutritivo |
| 10 | Crecimiento vegetativo - color crema; Micelio aéreo - ninguno; Pigmento soluble - ninguno; Hidrólisis del almidón - buena. Agar gelatina nutritivo |
| 15 | Crecimiento vegetativo - color crema; Micelio aéreo - ninguno; Pigmento soluble - ninguno; Licuefacción de la gelatina - buena. Placas de gelatina |
| 20 | Crecimiento vegetativo - tostado; Micelio aéreo - ninguno; Pigmento soluble - ninguno; Licuefacción de la gelatina - completa. Agar leche descremada |
| 25 | Crecimiento vegetativo - tostado; Micelio aéreo - ninguno; Pigmento soluble - ninguno; Hidrólisis de la caseína - buena. Leche de tornasol |
| 30 | Crecimiento vegetativo - anillo de crecimiento tostado; |

1 Micelio aéreo - ninguno;
Color - púrpura parduzco;
Coagulación y/o peptonización - peptonización completa,
volviéndose alcalina, pH 8,0.

5 Leche descremada
Crecimiento vegetativo - tostado, anillo de crecimiento
moderado;

Micelio aéreo - ninguno;
Pigmento soluble - marrón claro;

10 Coagulación y/o peptonización - peptonización completa,
volviéndose alcalina, pH 8,5.

Trozo de patata

Crecimiento vegetativo - bueno, color tostado;
Micelio aéreo - muy escaso, blanquecino;

15 Pigmento soluble - ninguno.

Suero sanguíneo de Loeffler

Crecimiento vegetativo - color crema;

Micelio aéreo - ninguno;

Pigmento soluble - ninguno;

20 Licuefacción - nula.

Agar tirosina

Crecimiento vegetativo - tostado;

Micelio aéreo - ninguno;

Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio;

25 Descomposición de la tirosina - muy ligera.

Todas las lecturas indicadas anteriormente fueron tomadas al cabo de 3 semanas de incubación a 28°C, salvo indicación en contrario. El pH de los medios utilizados en estos estudios era aproximadamente neutro, es decir, pH 6,8-7,2.

30 Las designaciones de color utilizadas en la descripción están

1 de acuerdo con las definiciones del Color Harmony Manual,
cuarta edición (1958), Container Corporation of América,
Chicago, Illinois.

5 También se determinó la capacidad del Streptomyces
flavogriseus NRRL 8140 para utilizar o asimilar diversos
hidratos de carbono. Para este fin, el microorganismo fué
cultivado sobre un medio sintético basal (Pridham y Gottlieb)
conteniendo 1 % del hidrato de carbono a 28°C, durante 3 se-
manas. El pH de los medios empleados en el estudio era apro-
ximadamente neutro (6,8-7,2). La Tabla II muestra la utili-
10 zación de estas fuentes de hidratos de carbono por el
Streptomyces flavogriseus NRRL 8140, donde: + = buen creci-
miento, + = crecimiento pobre y - = crecimiento nulo sobre
el hidrato de carbono particular.

15

TABLA II

| | | | |
|-------------|----------|----------|----------|
| Glucosa | + | Maltosa | + |
| Arabinosa | + | Manitol | + |
| Celulosa | - | Manosa | + |
| Fructosa | + | Rafinosa | <u>+</u> |
| 20 Inositol | <u>+</u> | Ramnosa | + |
| Lactosa | + | Sacarosa | <u>+</u> |
| Xilosa | + | | |

25

El grado de crecimiento al variar la temperatura y el
oxígeno requerido por el microorganismo es el siguiente:

Temperaturas (agar extracto de levadura-dextrosa + sales):

28°C = bueno

37°C = crecimiento vegetativo moderado; no hay hifas
aéreas

50°C = crecimiento nulo.

30

Oxígeno requerido (cultivo en placas en agar extracto de le-

1 vadura-dextrosa + sales):

 Aerobio.

 Se sobreentiende que para la producción de los nuevos
antibióticos de esta invención, la misma no se limita al
5 organismo Streptomyces flavogriseus o a los organismos que
responden totalmente a las características de crecimiento y
microscópicas dadas con fines ilustrativos. De hecho, se de-
sea y pretende incluir el uso de los mutantes producidos
a partir del organismo descrito por diversos medios, tales
10 como radiación X, radiación ultravioleta, mostaza nitrogena-
da, exposición a fagos y similares.

 Los nuevos antibióticos de la invención, 890A₂ y 890A₅,
son producidos durante la fermentación aerobia, bajo condi-
ciones controladas, de medios nutritivos acuosos adecuados,
15 inoculados con cepas del organismo Streptomyces flavogriseus.
Son adecuados para la producción de los antibióticos 890A₂ y
890A₅ los medios acuosos como los empleados para la produc-
ción de otros antibióticos. Estos medios contienen fuentes
de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, asimilables por
20 el microorganismo.

 En general, como fuentes de carbono asimilables en el
medio nutritivo, pueden utilizarse, sólo o en combinación,
hidratos de carbono como azúcares, por ejemplo dextrosa, glu-
25 cosa, fructosa, maltosa, sacarosa, xilosa, manitol y simila-
res y almidones como dextrina o como granos, por ejemplo ave-
na, centeno, almidón de maíz y harina de maíz y similares.
La cantidad exacta de la fuente o fuentes de hidratos de car-
bono utilizada en el medio depende en parte de los otros
ingredientes del medio pero, en general, habitualmente la
30 cantidad de hidrato de carbono varía entre 1 % y 6 % del pe-

1 so del medio, aproximadamente. Estas fuentes de carbono pue-
den ser utilizadas individualmente o pueden combinarse en el
medio varias de estas fuentes. En general, pueden utilizarse
5 muchos materiales proteicos como fuentes de nitrógeno en el
proceso de fermentación. Las fuentes de nitrógeno adecuadas
son, por ejemplo, hidrolizados de levadura, levadura prima-
ria, harina de soja, harina de algodón, hidrolizados de caseí-
na, licor de infusión de maíz, solubles de destilería o pas-
ta de tomate y similares. Las fuentes de nitrógeno, sólas o
10 en combinación, se utilizan en proporciones que oscilan apro-
ximadamente entre 0,2 y 6 % del peso del medio acuoso.

Entre las sales inorgánicas nutritivas que pueden incor-
porarse a los medios de cultivo se encuentran las sales ha-
bituales capaces de formar iones sodio, potasio, amonio, cal-
15 cio, magnesio, fosfato, sulfato, cloruro, carbonato y simi-
lares. También están incluidos los metales traza como cobal-
to, manganeso y hierro.

Debe observarse que los medios descritos en los ejemplos
son simplemente ilustrativos de la amplia variedad de medios
20 que pueden emplearse y no se pretende que sean limitativos.

La fermentación se realiza a temperaturas comprendidas
entre 20 y 37°C aproximadamente; sin embargo, para obtener
resultados óptimos, es preferible efectuar la fermentación
a temperaturas de 23 a 28°C aproximadamente. El pH inicial
25 de los medios nutritivos adecuados para cultivar cepas del
Streptomyces flavogriseus y producir los antibióticos 890A₂
y 890A₅ puede variar aproximadamente entre 6,0 y 8,0.

Aunque los nuevos antibióticos 890A₂ y 890A₅ son pro-
ducidos mediante cultivos superficiales y sumergidos, se
30 prefiere efectuar la fermentación en estado sumergido.

1 Es conveniente realizar una fermentación a pequeña es-
cala del antibiótico mediante inoculación de un medio nutri-
tivo adecuado con el cultivo productor de antibiótico y, des-
pués de la transferencia a un medio de producción, permitiend
5 que la fermentación transcurra a una temperatura constante
de unos 28°C en un sacudidor, durante varios días.

La fermentación es iniciada en un matraz esterilizado
de medio nutritivo, a través de una o más fases de siembra.
El medio nutritivo de la fase de siembra puede ser cualquier
10 combinación adecuada de fuentes de carbono y nitrógeno. El
matraz de siembra se sacude en una cámara a temperatura cons-
tante de unos 28°C durante un día, 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 pro-
15 ducción. Los matraces de siembra de las fases intermedias,
cuando se utilizan, se desarrollan esencialmente de la misma
forma; es decir, parte del contenido del matraz procedente de
la última fase de siembra se utiliza para inocular el medio
de producción. Los matraces inoculados se sacuden a tempera-
20 tura constante durante varios días y al final del periodo
de incubación se centrifuga o filtra el contenido del matraz.

Para el trabajo a gran escala, es preferible efectuar
la fermentación en tanques adecuados provistos de un agita-
dor y medios de airear el medio de fermentación.

25 De acuerdo con este método, el medio nutritivo se pre-
para en el tanque y se esteriliza calentándolo a temperaturas
de hasta unos 120°C. Al enfriar, el medio esterilizado se ino-
cula con una siembra previamente cultivada del cultivo produc-
tor y se permite que transcurra la fermentación durante un
30 cierto periodo de tiempo, por ejemplo de 1 a 6 días, mientras

1 se agita y/o airea el medio nutritivo y se mantiene la temperatura alrededor de 24-28°C. Este método de producción de los antibióticos 890A₂ y 890A₅ es especialmente adecuado para la preparación de grandes cantidades de los antibióticos.

5 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS 890A₂ Y 890A₅.

Propiedades del antibiótico 890A₂

El antibiótico 890A₂ es una sustancia ácida que se mueve hacia el polo positivo por electroforesis a pH neutro.

10 La sal sódica del antibiótico 890A₂ es un polvo blanco cuando se liofiliza de una solución acuosa y es muy soluble en agua.

15 El espectro de absorción ultravioleta presenta máximos a 308 y 228 nm y un mínimo a 262 nm. El E % a 308 nm de la sal sódica del antibiótico 890A₂ en agua a pH neutro se estima que es superior a 490. La relación de los valores de la absorción, A_{308}/A_{260} , es 1,91 y A_{308}/A_{228} es 1,02 para las mejores muestras obtenidas; la evidencia de pequeñas cantidades de impurezas que quedan en estas muestras sugieren que las relaciones pueden ser ligeramente más altas para una muestra de pureza definitiva.

20 Más del 80 % de la absorción a 308 nm puede ser eliminado por reacción con hidroxilamina y se observa una disminución similar por reacción con cisteína. La absorción a 260 nm después de estas reacciones aumenta aproximadamente en la cuarta parte de la magnitud de la disminución de A_{308} .
25 Bajo las condiciones descritas en la sección titulada Bioanálisis III para determinar los valores $AEHA_{308}$, la cinética de la reacción parece ser de primer orden con una vida media a la temperatura ambiente comprendida entre 0,5 y 1,5 minutos.
30

1 La siguiente tabla contiene las señales de RMN a
100 MHz para la sal sódica de 890A₂ en D₂O, relativa al pa-
trón interno 2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonato sódico,
denominado en lo que sigue DSS; los desplazamientos químicos
5 están dados en ppm y las constantes de acoplamiento en Hz;
están indicadas las multiplicidades aparentes.

1,33 (d, J = 6, CH₃-CH); 2,07 (s, CH₃C=O); 3,15 (m,
-C-CH₂-C); 3,69 (m, >CH-C=O); ~ 4,3 (>CHN y >CH-OH), 6,09
y 7,12 (dobletes, J = 13,5, S-CH=CH-N).

10 La potencia antibiótica del 890A₂; medida sobre Vibrio
percolans ATCC 8461 como se describe en la sección titulada
Bioanálisis I, es aproximadamente de 180 unidades por unidad
de AEHA₃₀₈.

Propiedades del antibiótico 890A₅

15 El antibiótico 890A₅ es una sustancia ácida que se mue-
ve hacia el polo positivo por electroforesis a pH neutro.

La sal sódica es un polvo blanco cuando se liofiliza
en una solución acuosa.

20 El espectro de absorbancia ultravioleta presenta máxi-
mos a 308,5 y 228 nm y un mínimo a 262 nm. El E % a 308,5 nm
de una solución de la sal sódica del antibiótico 890A₅ en
agua a pH neutro se estima en 490 para una muestra pura; la
relación de absorbancias A₃₀₈/A₂₆₀ es 2,0 y la relación
25 A₃₀₈/A₂₂₈ es 1,03. Más del 90 % de la absorción a 308 nm pue-
de ser eliminada por reacción con hidroxilamina, dando un pro-
ducto con una absorbancia mayor a 260 nm. La magnitud del
aumento de A₂₆₀ es aproximadamente un cuarto de la disminución
de A₃₀₈. La cinética de la disminución de A₃₀₈ bajo las con-
30 diciones descritas para medir la AEHA₃₀₈ parece ser de primer
orden, con una vida media a la temperatura ambiente compren-

1 dida entre 1 y 3 minutos.

5 El espectro de dicroísmo circular del 890A₅ tiene un máximo positivo a 304 nm, con una elipticidad específica de 7189 grados-ml por decímetro-gramo, un punto de elipticidad cero a 257,5 nm y un mínimo negativo de 220 nm, con una elipticidad específica de -21.218 grados-ml por decímetro-gramo. Para calcular estos valores, se estima la concentración de 890A₅ a partir de la absorbancia a 308 nm, utilizando un valor E % de 490 a esta longitud de onda.

10 La siguiente tabla contiene las señales de RMN a 100 MHz para la sal sódica de 890A₅ en D₂O, relativa al patrón interno DSS; los desplazamientos químicos están dados en ppm y las constantes de acoplamiento en Hz; están indicadas las multiplicidades aparentes.

15 1,29 (d, J = 6,2, $\text{CH}_3\text{-CH}$); 2,05 (s, $\text{CH}_3\text{C=O}$); 3,09 (aproximadamente d de d, $\text{-}\overset{|}{\text{C}}\text{-}\overset{|}{\text{CH}_2}\text{-}\overset{|}{\text{C}}$); 3,41 (d de d, J = 5,0, 3,0, >CH-C=O); 4,16 (m, >CH-N y >CH-OH); 6,00 y 7,11 (dobletes, J = 13,8, S-CH=CH-N).

20 La potencia antibiótica del 890A₅, medida sobre Vibrio percolans ATCC 8461, es de 12 unidades por unidad AEHA₃₀₈.

Análisis espectral de masas del 890A₂ y del 890A₅

25 Los datos del espectro de masas para el 890A₅ se obtienen sobre derivados trimetilsilílicos, preparados a partir de sales amónicas del antibiótico con bis-trimetilsililtri-fluoracetamida en dimetilformamida. La conversión de la sal sódica del antibiótico en las sales amónicas se realiza utilizando la sal amónica de una resina ácida cambiadora de ion.

30 La trimetilsililación de los antibióticos 890A₂ y 890A₅ da lugar a tres derivados diferentes: un derivado di- y un derivado tri-trimetilsililado (pesos moleculares 456 y 528, respec

1 100 x 15 mm conteniendo 5 ml de agar nutritivo sembrado a
0,2 % de extracto de levadura. Los resultados, expresados
como diámetro en milímetros de la zona de inhibición, están
indicados en la Tabla III.

5 Los espectros de los antibióticos 890A₂ y 890A₅ son
bastante similares, excepto para la resistencia del 890A₅ a
la inactivación por la penicilinasa Difco y la lactamasa o
lactamasas producidas por una cepa resistente a la cefalospo-
rina C de Vibrio percolans (MB-2566). Los resultados también
indican que el antibiótico 890A₂ es marcadamente más potente
que el 890A₅.

10

15

20

25

30

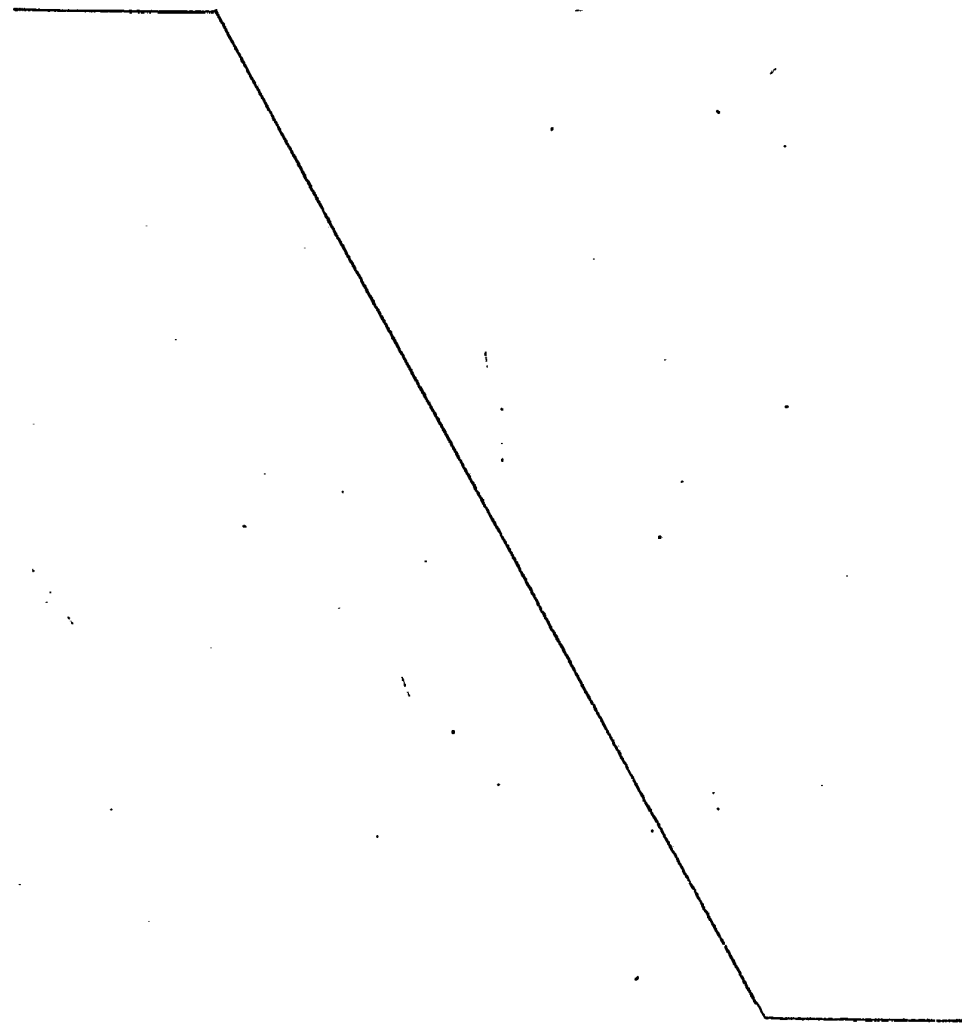


TABLA III

Perfil del espectro antibacteriano in vitro (PEA) de los antibióticos 890A₂ y 890A₅

| Organismo | Merck n° | ATCC n° | Diámetro de la zona de inhibición, mm | |
|------------------------------------|----------|---------|---------------------------------------|------------------------------|
| | | | 890A ₂ - 5 µg/ml | 890A ₅ - 33 µg/ml |
| <u>Bacillus</u> sp. | MB-633 | - | 40 | 18 |
| <u>Proteus vulgaris</u> | MB-1012 | - | 11 | 23 |
| <u>Pseudomonas aeruginosa</u> | MB-979 | - | 0 | 0 |
| <u>Serratia marcescens</u> | - | 990 | 22 | 29 |
| <u>Staphylococcus aureus</u> | - | 6533 P | 34 | 34 |
| <u>Bacillus subtilis</u> | - | 6633 | 42 | 27 |
| <u>Sarcina lutea</u> | - | 9341 | 42 | 40 |
| <u>Staphylococcus aureus</u> | MB-698 | - | 30 | 35 |
| <u>Streptococcus faecalis</u> | MB-753 | - | 12 | 0 |
| <u>Alcaligenes faecalis</u> | - | 213 | 34 | 25 |
| <u>Bruceella bronchiseptica</u> | - | 4617 | 29 | 22 |
| <u>Salmonella gallinarum</u> | MB-1287 | - | 33 | 26 |
| <u>Vibrio parcolans</u> | - | 8461 | 31 | 32 |
| <u>Xanthomonas vesicatoria</u> | MB-815 | - | 29 | 20 |
| <u>Proteus vulgaris</u> | - | 21.100 | 30 | 27 |
| <u>Escherichia coli</u> | MB-1418 | - | 32 | 27 |
| <u>Pseudomonas stutzeri</u> | - | 11.607 | 19 | 14 |
| <u>Klebsiella pneumoniae</u> | MB-1264 | - | 31 | 27 |
| <u>Aerobacter aerogenes</u> | MB-835 | - | 27 | 24 |
| <u>Erwinia atroseptica</u> | - | 4466 | 26 | 21 |
| <u>Pseudomonas aeruginosa</u> | MB-2824 | - | 13 | 0 |
| <u>Corynebacterium pseudodiph.</u> | - | 9742 | 35 | 33 |
| <u>Escherichia coli</u> | - | 9637 | 29 | 24 |
| <u>Streptococcus faecium</u> | MB-2820 | - | 22 | 0 |
| <u>Streptococcus agalactiae</u> | MB-2875 | - | 32 | 27 |

1

5

10

15

20

25

30

1

TABLA III

Perfil del espectro antibacteriano in vitro (PEA) de los anti

| | <u>Organismo</u> | <u>Merck n°</u> | <u>ATCC n°</u> |
|----|------------------------------------|-----------------|----------------|
| 5 | <u>Bacillus sp.</u> | MB-633 | - |
| | <u>Proteus vulgaris</u> | MB-1012 | - |
| | <u>Pseudomonas aeruginosa</u> | MB-979 | - |
| | <u>Serratia marcescens</u> | - | 990 |
| 10 | <u>Staphylococcus aureus</u> | - | 6533 P |
| | <u>Bacillus subtilis</u> | - | 6633 |
| | <u>Sarcina lutea</u> | - | 9341 |
| | <u>Staphylococcus aureus</u> | MB-698 | - |
| | <u>Streptococcus faecalis</u> | MB-753 | K- |
| 15 | <u>Alcaligenes faecalis</u> | - | 213 |
| | <u>Brucella bronchiseptica</u> | - | 4617 |
| | <u>Salmonella gallinarum</u> | MB-1287 | - |
| | <u>Vibrio percolans</u> | - | 8461 |
| | <u>Xanthomonas vesicatoria</u> | MB-815 | - |
| 20 | <u>Proteus vulgaris</u> | - | 21.100 |
| | <u>Escherichia coli</u> | MB-1418 | - |
| | <u>Pseudomonas stutzeri</u> | - | 11.607 |
| | <u>Klebsiella pneumoniae</u> | MB-1264 | - |
| | <u>Aerobacter aerogenes</u> | MB-835 | - |
| 25 | <u>Erwinia atroseptica</u> | - | 4466 |
| | <u>Pseudomonas aeruginosa</u> | MB-2824 | - |
| | <u>Corynebacterium pseudodiph.</u> | - | 9742 |
| | <u>Escherichia coli</u> | - | 9637 |
| | <u>Streptococcus faecium</u> | MB-2820 | - |
| 30 | <u>Streptococcus agalactiae</u> | MB-2875 | - |

TABLA III

ro antibacteriano in vitro (PEA) de los antibióticos 890A₂ y 890A₅

| Merck n° | ATCC n° | Diámetro de la zona de inhibición, mm | |
|----------|---------|---------------------------------------|------------------------------|
| | | 890A ₂ - 5 µg/ml | 890A ₅ - 33 µg/ml |
| MB-633 | - | 40 | 18 |
| MB-1012 | - | 11 | 23 |
| MB-979 | - | 0 | 0 |
| - | 990 | 22 | 29 |
| - | 6538 P | 34 | 34 |
| - | 6633 | 42 | 27 |
| - | 9341 | 42 | 40 |
| MB-698 | - | 30 | 35 |
| MB-753 | K- | 12 | 0 |
| - | 213 | 34 | 25 |
| - | 4617 | 29 | 22 |
| MB-1287 | - | 33 | 26 |
| - | 8461 | 31 | 32 |
| MB-815 | - | 29 | 20 |
| - | 21.100 | 30 | 27 |
| MB-1418 | - | 32 | 27 |
| - | 11.607 | 19 | 14 |
| MB-1264 | - | 31 | 27 |
| MB-835 | - | 27 | 24 |
| - | 4466 | 26 | 21 |
| MB-2824 | - | 13 | 0 |
| - | 9742 | 35 | 33 |
| - | 9637 | 29 | 24 |
| MB-2820 | - | 22 | 0 |
| MB-2875 | - | 32 | 27 |

TABLA III (continuación)

| Organismo | Merck n° | ATCC n° | Diámetro de la zona de inhibición, mm | |
|---|----------|---------|---------------------------------------|------------------------------|
| | | | 890A ₂ - 5 µg/ml | 890A ₅ - 33 µg/ml |
| <u>Vibrio percolans</u> resistente a la cefalosporina C | MB-2566 | - | 11 | 35 |
| <u>Proteus vulgaris</u> (episomo) ^a | MB-2112 | - | 33 | 23 |
| <u>Proteus mirabilis</u> | MB-3126 | - | 22 | 20 |
| <u>Staphylococcus aureus</u> (resistente a la meticilina) | MB-2949 | - | 11 | 15 |
| <u>Vibrio percolans</u> + 2 x 10 ⁵ unidades/ml de penicilina | MB-1272 | - | 7 | 40 |
| <u>Vibrio percolans</u> + lactamasa de <u>Aerobacter</u> | MB-1272 | - | 31 | 36 |

^a Este episodio comunica resistencia a la tetraciclina, al cloranfenicol, a la kanamicina y a la estreptomina, a una concentración de 20 µg/ml y a la neomicina a una concentración de 25 µg/ml y a las drogas sulfa.

1

TABLA III (continuaci

| | Organismo | Merck n° | ATCC n° |
|----|--|----------|---------|
| 5 | <u>Vibrio percolans</u> resistente a la cefalosporina C | MB-2566 | - |
| | <u>Proteus vulgaris</u> (episomo) ^a | MB-2112 | - |
| | <u>Proteus mirabilis</u> | MB-3126 | - |
| | <u>Staphylococcus aureus</u> (resistente a la meticilina) | MB-2949 | - |
| 10 | <u>Vibrio percolans</u> + 2 x 10 ⁵ unidades/ml de penicilinas | MB-1272 | - |
| | <u>Vibrio percolans</u> + lactamasa de <u>Aerobacter</u> | MB-1272 | - |

10

^a Este episomo comunica resistencia a la tetraciclina, al cloranfenicol, a una concentración de 20 µg/ml y a la neomicina a una concentración de

15

20

25

30

TABLA III (continuación)

| | Merck n° | ATCC n° | Diámetro de la zona de inhibición, mm | |
|----------------------|----------|---------|---------------------------------------|------------------------------|
| | | | 890A ₂ - 5 µg/ml | 890A ₅ - 33 µg/ml |
| la cefalosporina C | MB-2566 | - | 11 | 35 |
| | MB-2112 | - | 33 | 23 |
| | MB-3126 | - | 22 | 20 |
| te a la met icilina) | MB-2949 | - | 11 | 15 |
| dades/ml de penicil | | | | |
| | MB-1272 | - | 7 | 40 |
| e <u>Aerobacter</u> | MB-1272 | - | 31 | 36 |

encia a la tetraciclina, al cloranfenicol, a la kanamicina y a la estreptomycin, /ml y a la neomicina a una concentración de 25 µg/ml y a las drogas sulfa.

1 El antibiótico 890A₂ presenta actividad in vivo con-
tra organismos Gram-negativos y Gram-positivos y, por lo
tanto, es útil para controlar las infecciones bacterianas
en los animales y en el hombre. Para determinar la actividad
5 in vivo, el antibiótico 890A₂ se disuelve en NaCl 0,15M,
fosfato sódico 0,01M, pH 7,0 y se diluye con agua para dar
cinco concentraciones diluídas al cuádruple de la droga para
su ensayo. Unos ratones hembras blancos suizos, con un peso
de unos 21 g por término medio, se infectan intraperitoneal-
mente con el organismo de ensayo suspendido en caldo. Se de-
termina el número de organismos inyectados por técnicas de
recuento en placa normalizadas. En el momento de la infec-
ción y de nuevo 6 horas más tarde, algunos de los ratones
son tratados intraperitonealmente con el antibiótico. Se uti-
lizaron 5 ratones para cada concentración de la droga ensa-
yada. Otros 2 ratones más, no infectados, se trataron con el
antibiótico para determinar si la cantidad de agente inyecta-
da era tóxica. Se incluyeron controles de 5 ratones para ca-
da una de las diversas diluciones del cultivo infectante en
20 cada ensayo, con objeto de calcular los números de organis-
mos que eran letales al 50 % de los ratones infectados y no
tratados (DL₅₀). Este cálculo se realizó utilizando los da-
tos de supervivencia al séptimo día después de la infección.
para cuyo tiempo también se calculó la cantidad de la droga
que debe proteger al 50 % de los ratones infectados (DE₅₀).

25 Todos los animales que recibieron este ataque y no
fueron tratados con el antibiótico murieron dentro de las
48 horas subsiguientes a la infección. La eficacia del anti-
biótico 890A₂, con una potencia de 59 unidades/ml, contra
30 Salmonella schottmuelleri MB-2837 está indicada a continuación:

| Unidades/ml ^a | Vía | DE ₅₀ x 2 dosis Unidades |
|--------------------------|------|--|
| 59 | i.p. | 19 |

^a

La unidad/ml está definida bajo el título Bioanálisis I.

Los antibióticos 890A₂ y 890A₅ son valiosos antibióticos activos contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y, por consiguiente, encuentran aplicación en medicina humana y en veterinaria. Los compuestos de esta invención pueden ser utilizados sólo o en combinaciones entre sí como drogas antibacterianas para el tratamiento de las infecciones causadas por las bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, por ejemplo contra Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Salmonella schottmuelleri. Los materiales antibacterianos de la invención pueden ser utilizados además como aditivos de los piensos para animales, para la preservación de alimentos y como desinfectantes. Por ejemplo, pueden emplearse en composiciones acuosas a concentraciones que oscilan aproximadamente entre 0,1 y 100 partes de antibiótico por millón de partes de solución o preferiblemente a concentraciones que oscilan aproximadamente entre 1 y 10 partes de antibiótico por millón de partes de solución, para destruir e inhibir el crecimiento de las bacterias perjudiciales sobre el equipo dental y médico y como bactericidas en aplicaciones industriales, por ejemplo en las pinturas acuosas y en el agua blanca de las fábricas de papel para inhibir el crecimiento de bacterias perjudiciales.

Los antibióticos de esta invención pueden ser utilizados en diversos preparados farmacéuticos como únicos ingredientes activos o en combinación con uno o más antibióticos

1 distintos o con una o más sustancias farmacológicamente
activas. Como ejemplo de los primeros, un antibiótico de
aminociclitol, como la gentamicina, puede ser coadministra-
do para reducir al mínimo cualquier oportunidad de que sur-
5 jan organismos resistentes. Como ejemplo de las últimas, pue-
den combinarse el difenoxilato y la atropina en formas de
dosificación destinadas a la terapia de la gastroenteritis.
Los antibióticos pueden emplearse en forma de cápsulas o co-
mo tabletas, polvos, soluciones o suspensiones líquidas o
10 elixires. Pueden ser administrados por vía oral, tópica,
intravenosa o intramuscular. Además, los antibióticos 890A₂
y 890A₅ pueden ser utilizados en combinaciones entre sí.

Las tabletas y cápsulas para administración oral pue-
den presentarse como dosis unitarias y pueden contener exci-
15 pientes convencionales tales como agentes ligantes, por ejem-
plo jarabes, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o
polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar,
almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubri-
cantes, por ejemplo estearato magnésico, talco, polietilen-
20 glicol y sílice; desintegrantes, por ejemplo almidón de pa-
tata o agentes humectantes aceptables como laurilsulfato
sódico. Las tabletas pueden recubrirse siguiendo métodos
muy conocidos en este campo. Los preparados líquidos orales
pueden encontrarse en forma de suspensiones, soluciones o
25 emulsiones acuosas u oleosas, jarabes, elixires, etc, o pue-
den presentarse como producto seco para su reconstitución con
agua u otros vehículos adecuados antes de su uso. Estos pre-
parados líquidos pueden contener los aditivos convencionales
tales como agentes suspensores, por ejemplo jarabe de sorbi-
30 tol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidro-

1 xietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de
aluminio o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsio-
nantes como por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitano o
5 goma arábica; vehículos no acuosos entre los que pueden en-
contrarse los aceites comestibles, por ejemplo aceite de almendra,
aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol o alcohol etílico; preservativos, por ejemplo p-hidroxibenzoatos de metilo o de propilo o ácido sórbico. Los supositorios contendrán las bases convencionales para supositorios, v.g. manteca de cacao u otro glicérido.

10 Las composiciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitarias en ampollas o en envases de dosis múltiples con un preservativo agregado. Las composiciones pueden adoptar la forma de suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede encontrarse en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, v.g. agua estéril y exenta de pirógenos, antes de su uso.

15 Las composiciones también pueden prepararse en formas adecuadas para su absorción a través de las membranas mucosas de la nariz y de la garganta o de los tejidos bronquiales y pueden convenientemente adoptar la forma de polvo o nebulizaciones o inhalaciones líquidas, trochas, pinturas para la garganta, etc. Para la medicación de los ojos u oídos, los preparados pueden presentarse como cápsulas individuales, en forma líquida o semisólida, o pueden utilizarse como gotas, etc. Las aplicaciones tópicas pueden ser formuladas en bases hidrófobas o hidrófilas, como ungüentos, cremas, lociones,

20
25
30

1

pinturas, polvos, etc.

5

Asimismo, además de un vehículo, estas composiciones pueden contener otros ingredientes como estabilizantes, li-
gantes, antioxidantes, preservativos, lubricantes, agentes
suspensores, agentes modificadores de la viscosidad o agen-
tes aromatizantes y similares. En veterinaria, por ejemplo en
el tratamiento de pollos, vacas, corderos, cerdos y simila-
res, la composición puede ser formulada, por ejemplo, como
preparado intramamario en bases de acción prolongada o de
liberación rápida.

10

15

La dosis a administrar depende en alto grado del esta-
do 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 ge-
neralizadas y la vía oral para las infecciones intestinales.

20

25

En el tratamiento de las infecciones bacterianas en
el hombre, los compuestos de esta invención se administran
por vía oral o parenteral, siguiendo procedimientos conven-
cionales para la administración de antibióticos, en una pro-
porción que oscila aproximadamente entre 2 y 600 mg/kg/día
y preferiblemente entre 5 y 100 mg/kg/día, en dosis preferen-
temente fraccionadas, v.g. 3 a 4 veces al día. Pueden ser ad-
ministrados en dosis unitarias que contienen, por ejemplo,
100, 330, 400 o 1000 mg de ingrediente activo, con vehículos
o excipientes adecuados, fisiológicamente aceptables. Las do-
sis unitarias están en forma de preparados líquidos como solu-
ciones o suspensiones o como sólidos en tabletas o cápsulas.

30

Naturalmente, se sobreentiende que la dosis óptima en cual-
quier caso dado dependerá del tipo y gravedad de la infección
que ha de ser tratada y que se emplearán dosis menores para

1 uso pediátrico, encontrándose al alcance de cualquier exper-
to en este campo estos ajustes.

5 Dentro de esta invención están incluidas las sales
no tóxicas y farmacéuticamente aceptables de los antibióti-
cos 890A₂ y 890A₅; por ejemplo, las sales farmacológicamen-
te aceptables formadas con bases orgánicas e inorgánicas en-
tre las que se encuentran, por ejemplo, las sales metálicas
derivadas de los hidróxidos, carbonatos o bicarbonatos de
10 metales alcalinos o alcalino-térreos, como las derivadas de
sodio, potasio, amonio y calcio y las sales derivadas de
aminas primarias, secundarias o terciarias como monoalquil-
aminas, dialquilaminas, trialquilaminas, alcanolaminas infe-
riores, dialcanolaminas inferiores, alquilendiaminas inferio-
res, N,N-dialquil-alquilen(inferior)diaminas, aralquilami-
15 nas, amino-alcanoles inferiores, N,N-dialquil(inferior)ami-
no-alcanoles inferiores, ácidos amino-, poliamino- y guanidi-
no-alcanoicos inferiores y aminas heterocíclicas nitrogena-
das. Como ejemplos representativos citaremos las sales deri-
vadas de hidróxido sódico, hidróxido amónico, carbonato só-
20 dico, bicarbonato sódico, carbonato potásico, hidróxido po-
tásico, carbonato cálcico, trimetilamina, trietilamina, pi-
peridina, N-etilpiperidina, morfolina, quinina, lisina, pro-
tamina, arginina, procaína, etanolamina, morfina, bencilami-
na, etilendiamina, N,N'-dibenciletetilendiamina, dietanolami-
25 na, piperazina, dimetilaminoetanol, 2-amino-2-metil-1-propa-
nol, teofilina, N-metilglucamina y similares.

30 Las sales de los compuestos de esta invención pueden
ser preparadas por métodos convencionales muy conocidos en
la técnica. Por ejemplo, las monosales como la sal monosódi-
ca obtenida por tratamiento de un equivalente de hidróxido

1 sódico con un equivalente del producto (I) en un disolvente
adecuado. También pueden prepararse sales mixtas con catio-
nes divalentes combinando un mol de una base divalente con
un mol del producto (I) más un equivalente de otro ácido.

5 Alternativamente, pueden obtenerse sales por tratamiento de
un equivalente de una base que contiene un catión divalente,
como hidróxido cálcico, con un equivalente del producto (I).
Las sales de esta invención son derivados no tóxicos y farma-
cológicamente aceptables que pueden ser utilizados como ingre-
10 diente activo en formas farmacéuticas de dosis unitarias ade-
cuadas. Asimismo, pueden ser combinadas con otras drogas pa-
ra formar composiciones con un amplio espectro de actividad.

15 Los caldos de fermentación que contienen los antibió-
ticos 890A₂ y 890A₅, producidos de acuerdo con los procedi-
mientos aquí descritos, presentan actividades que oscilan
entre 2 y 170 unidades por mililitro aproximadamente, cuando
se analizan por el ensayo de difusión en disco utilizando
Vibrio percolans (ATCC 8461). Los antibióticos 890A₂ y 890A₅
20 contenidos en estos caldos de fermentación pueden ser recu-
perados y purificados por diversos procedimientos. Uno de es-
tos procedimientos consiste en adsorber los antibióticos 890A₂
y 890A₅ sobre una resina cambiadora de anión fuertemente bási-
ca. Son ilustrativas de estas resinas cambiadoras de anión
25 fuertemente básicas las que poseen una matriz de estireno-di-
vinilbenceno, por ejemplo la resina de amonio cuaternario con
núcleos de poliestireno Dowex 1 x 2 (manufacturada por Dow
Chemical Co., Midland, Michigan), en el ciclo de cloruro.
Otros miembros representativos de esta clase de resinas cambia-
30 doras fuertemente básicas son los siguientes: Duolite A-40,
A-42, A-101, A-102 y A-114 (manufacturado por Chemical Process

1 Co., Redwood City, California); Amberlite IRA-400, IRA-401
e IRA-410. Alternativamente, puede utilizarse una resina
cambiadora de anión débilmente básica, tal como Amberlite
5 IRA-68. (Las resinas Amberlite son fabricadas por Rohm and
Haas, Washington Square, Filadelfia 5, Pensilvania).

El antibiótico adsorbido es fácilmente eluido de la
resina cambiadora de anión con soluciones salinas en meta-
nol acuoso al 50 % (en volumen). El eluato así obtenido pue-
de ser purificado todavía más, si se desea, por otros pro-
10 cedimientos de purificación. Así, el eluato puede ser puri-
ficado concentrándolo y haciéndolo pasar a través de una
columna rellena con un polímero de éster acrílico de polari-
dad intermedia, tal como XAD-7 u 8 o a través de una columna
rellena con un polímero de divinilbenceno reticulado, hidró-
15 fobo, no polar, y poliestireno, tal como XAD-1, 2 y 4, pre-
feriblemente XAD-2. (XAD-1, 2, 4, 7 y 8 son fabricadas por
Rohm and Haas, Washington Square, Filadelfia 5, Pensilvania).
Este procedimiento resuelve parcialmente los antibióticos
890A₂ y 890A₅. Las fracciones ricas en 890A₂ y las ricas en
20 890A₅ se reúnen. Las fracciones reunidas se purifican de
nuevo.

Un método de obtención de antibióticos 890A₂ y
890A₅ más purificados hace uso de la técnica de filtración
por gel, a través de un gel de poliacrilamida con un tamaño
25 de poro que excluye las moléculas con un peso molecular su-
perior a 1800, tal como Bio-Gel P-2 (fabricado por
Bio.Rad, Richmond, California). También pueden emplearse
para la desalación otros geles como Sephadex G-10.

El procedimiento preferido por el cual los antibió-
30 ticos 890A₂ y 890A₅ pueden ser obtenidos con gran pureza a

1 partir de un caldo consiste en centrifugar o filtrar el
caldo para separar los sólidos; adsorber y eluir el filtra-
do de una resina cambiadora de anión, como Dowex 1 x 2,
5 en el ciclo de cloruro, con NaCl al 3 % en metanol acuoso
al 50 % (en volumen) que a la vez concentra y purifica par-
cialmente los antibióticos; pasa por una columna de MAD-2
adecuadamente preparada, que retrasa a los antibióticos y
con ello purifica y desalifica el eluato de Dowex 1 x 2.
Además, el antibiótico 890A₅ es retrasado más que el anti-
10 biótico 890A₂ y por lo tanto se resuelven parcialmente los
dos antibióticos. Se reúnen las fracciones enriquecidas en
890A₂ y 890A₅ y se purifican de nuevo. Por cromatografía
en una resina de -400 mallas Dowex 1 x 2, eluyendo con NaCl
y/o NH₄Cl en metanol acuoso al 50 %, se obtiene un producto
15 exento de la mayoría de las impurezas adsorbentes de UV (el
NH₄Cl se utiliza para comunicar cierta capacidad reguladora
del pH al eluyente) y mediante desalación sobre Bio-Gel
P-2 o Sephadex G-10, se elimina la mayor parte de la sal
introducida en la cromatografía en Dowex-1 x 2.

20 Cuando se tratan por el procedimiento anterior los
caldos de poca potencia, el material final puede contener
cantidades significativas (más del 50 %) de impurezas resi-
duales. Estas impurezas pueden ser reducidas mediante un ci-
clo adicional de cromatografía sobre Dowex-1 x 2, -400 ma-
25 llas, eluyendo con una solución que contiene cloruro sódico
e isopropanol al 50 %. También es aconsejable, cuando el
antibiótico se aísla de caldos de baja potencia, realizar
una segunda etapa de cromatografía con XAD-2. Esto proporció-
na una purificación adicional, elimina la sal residual y re-
30 suelve parcialmente el antibiótico 890A₂ y el 890A₅. Especí-

1 ficamente, el 890A₅ eluye más tarde que el 890A₂ y los dos
pueden ser distinguidos por sus diferentes relaciones de bio-
actividad a AEHA₃₀₈. Las fracciones que presentan una rela-
5 ción de bioactividad sobre Vibrio percolans ATCC 8461 a
AEHA₃₀₈ de 180 unidades de bioactividad por unidad de
AEHA₃₀₈ contienen el antibiótico 890A₂ y las fracciones que
presentan una relación de bioactividad sobre Vibrio percolans
ATCC 8471 a AEHA₃₀₈ de 12 unidades de bioactividad por uni-
dad de AEHA₃₀₈ contienen el antibiótico 890A₅.

10 En la purificación por cromatografía en columna, en
general solamente se combinan para su posterior purificación
las fracciones del volumen eluido que contienen antibiótico
de una pureza del 30 % como mínimo, calculada con respecto
a la fracción más pura. Los criterios de pureza son las re-
15 laciones de bioactividad/A₂₂₀, A₃₀₈/A₂₆₀ y AEHA₃₀₈/A₂₂₀ y,
en los procesos de desalación, la conductividad. Así, para
cada etapa cromatográfica se miden la A₂₂₀, A₂₆₀, A₃₀₈ y la
bioactividad de las fracciones apropiadas. Siempre que es
posible se mide también la AEHA₃₀₈ y, en la desalación,
20 se miden las conductividades. Los criterios para decidir
que fracciones se combinan para las operaciones subsiguientes
pueden ser ajustados algo para conseguir un mayor ren-
dimiento, a expensas de la pureza o inversamente una mayor
pureza a expensas del rendimiento.

25 En las operaciones a escala de laboratorio (volumen
de muestra inferior a 20 litros), todas las cromatografías
excepto la cromatografía en XAD-2 se realizan en una cámara
fría a 2-5°C. La cromatografía en XAD-2 se realiza a la tem-
peratura ambiente salvo indicación en contrario. El pH de
30 las soluciones de antibiótico que han de ser almacenadas se

1 ajusta a 7-8 mediante adición cuidadosa de soluciones diluí-
das de NaOH o HCl. Las soluciones acuosas se mantienen en
un frigorífico o preferiblemente en agua de hielo y las so-
luciones en metanol al 50 % se almacenan a -20°C.

5 En las etapas de purificación anteriores a la cromatografía en XAD-2, las soluciones se llevan generalmente a 25 μ M en EDTA por adición de 1/4000 volúmenes de una solución de Na₂EDTA 0,1M que ha sido neutralizada a pH 7,0 por adición de hidróxido sódico ("EDTA neutro" 0,1M).

10 En las Figuras 1 y 2 se presentan los diagramas de flujo del procedimiento de purificación para la obtención de los antibióticos 890A₂ y 890A₅, respectivamente.

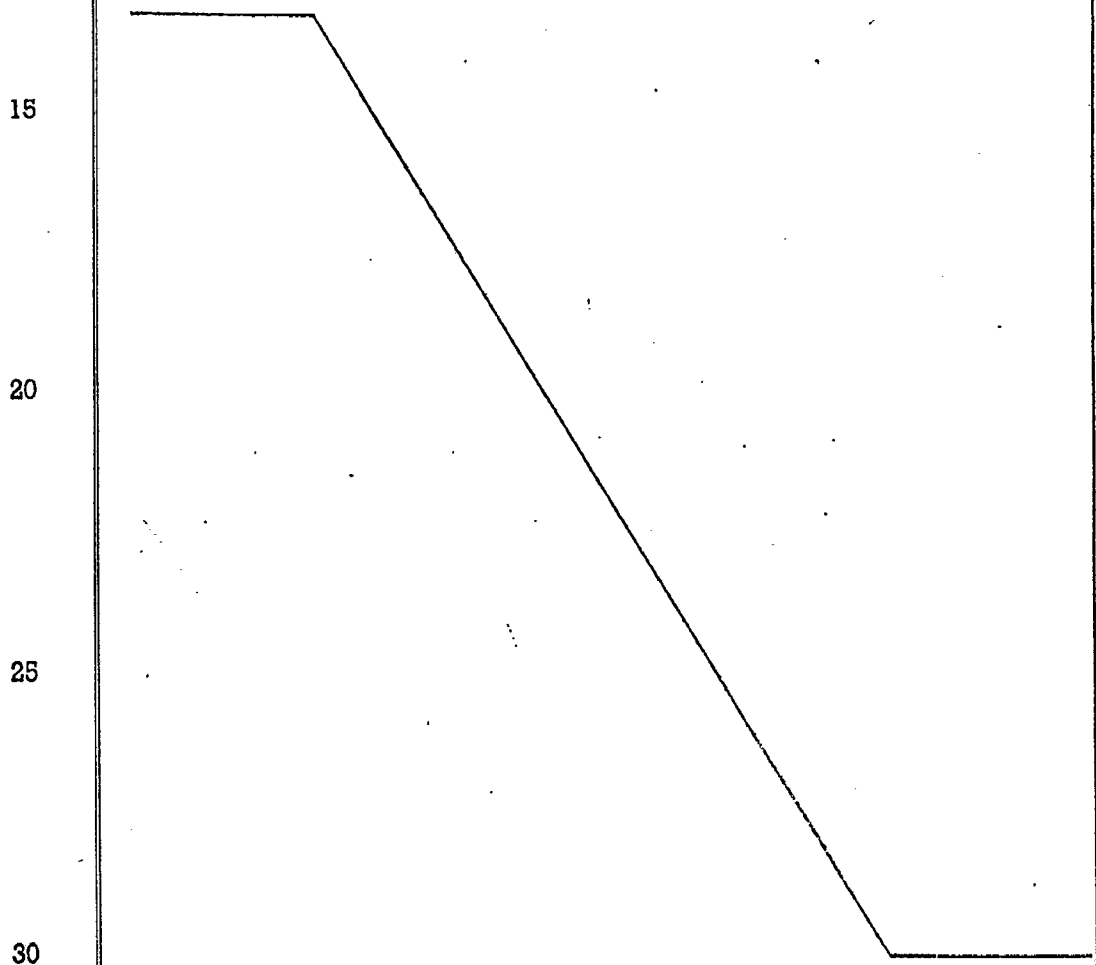


FIGURA 1

Esquema del proceso de purificación del antibi

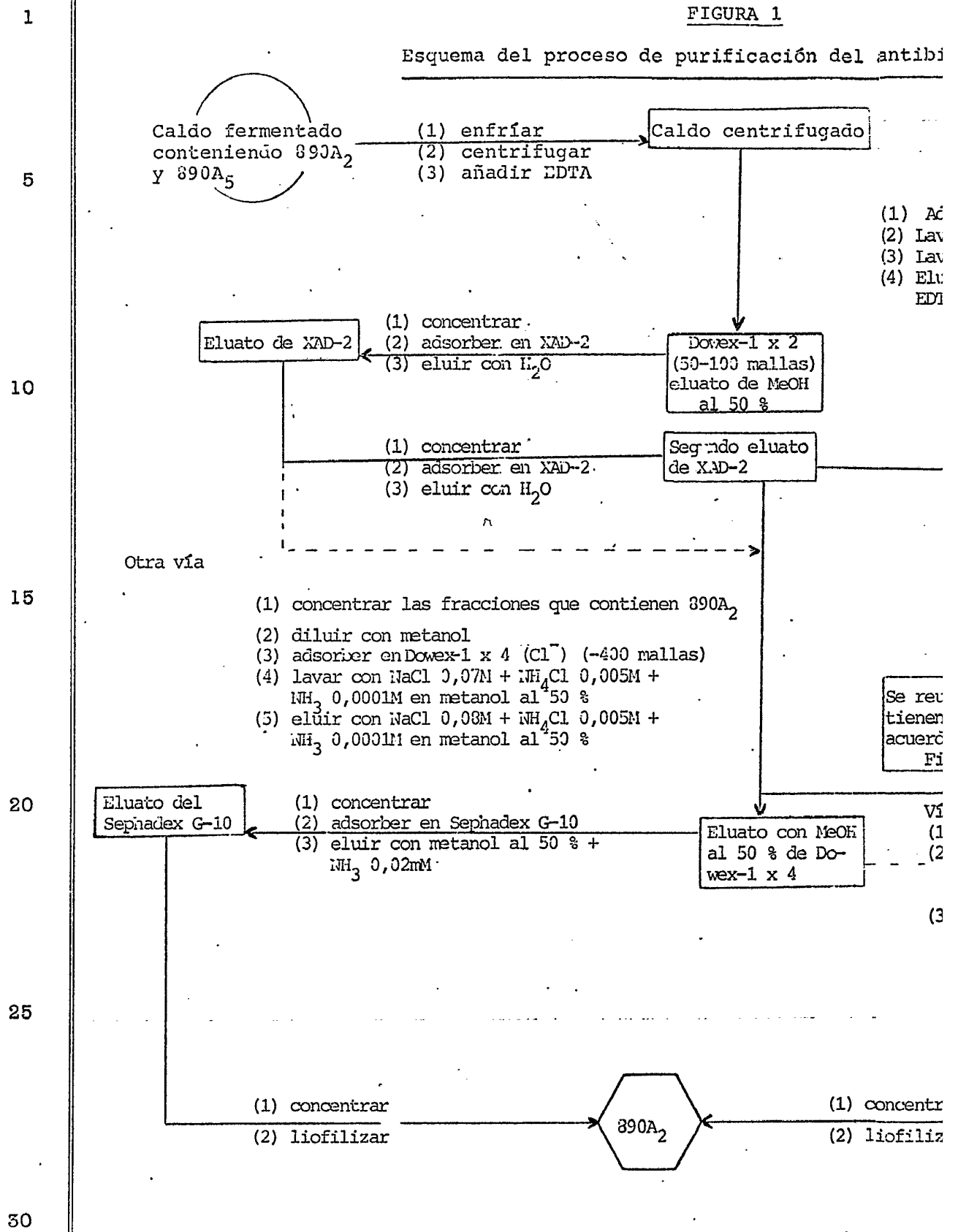


FIGURA 1

ma del proceso de purificación del antibiótico 890A₂

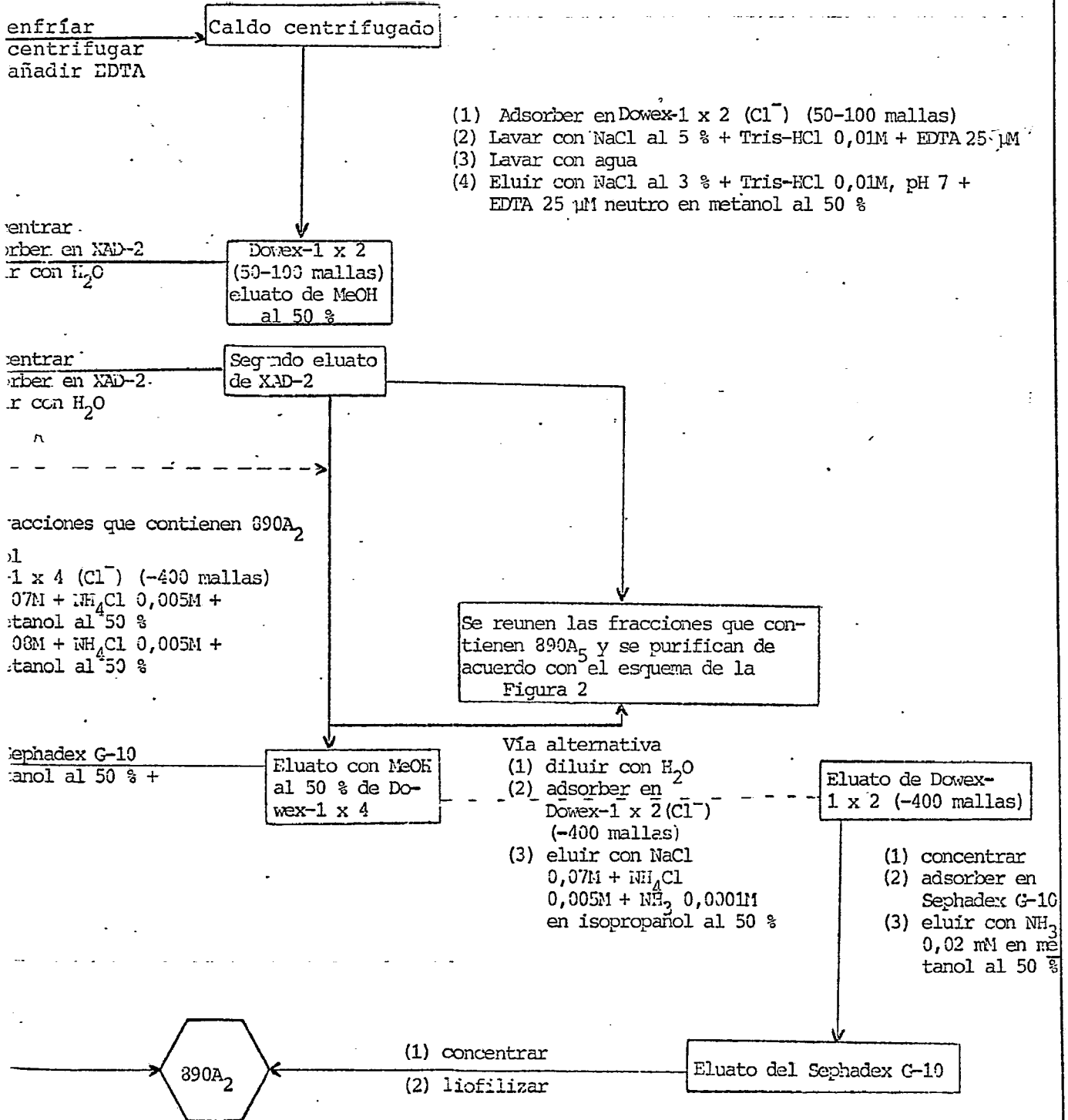
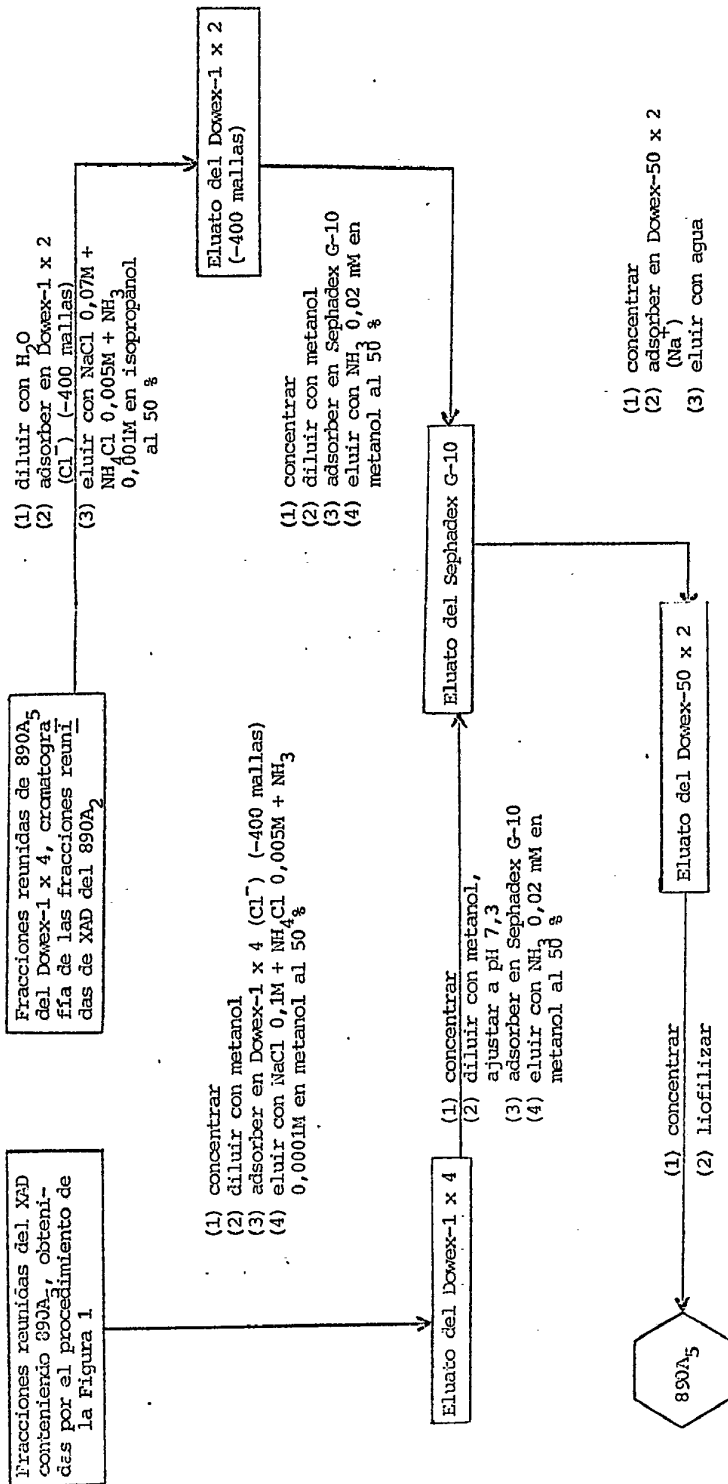


FIGURA 2

Esquema del proceso de purificación del antibiótico 890A₅



1

5

10

15

20

25

30

1

FIGURA 2

Esquema del proceso de purificación del antibióti

5

Fracciones reunidas del XAD
conteniendo 890A₂, obteni-
das por el procedimiento de
la Figura 1

Fracciones reunidas de 890A₅
del Dowex-1 x 4, cromatogra-
fía de las fracciones reuni-
das de XAD del 890A₂

10

- (1) concentrar
- (2) diluir con metanol
- (3) adsorber en Dowex-1 x 4 (Cl⁻) (-400 mallas)
- (4) eluir con NaCl 0,1M + NH₄Cl 0,005M + NH₃ 0,0001M en metanol al 50 %

15

Eluato del Dowex-1 x 4

- (1) concentrar
- (2) diluir con metanol,
ajustar a pH 7,3
- (3) adsorber en Sephadex G-10
- (4) eluir con NH₃ 0,02 mM en
metanol al 50 %

Eluato del Sepha

20

890A₅

- (1) concentrar
- (2) liofilizar

Eluato del Dowex-50 x 2

25

30

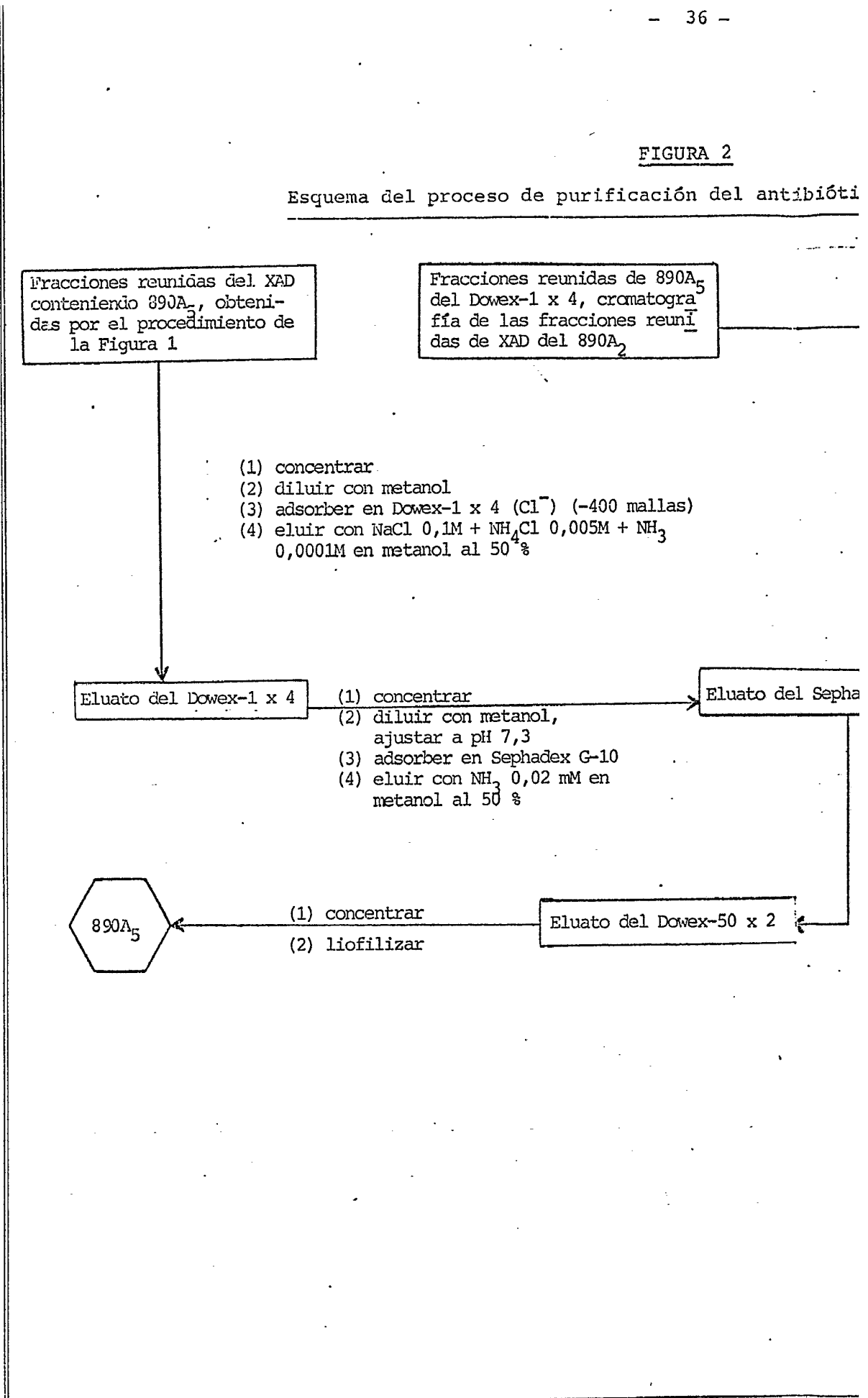
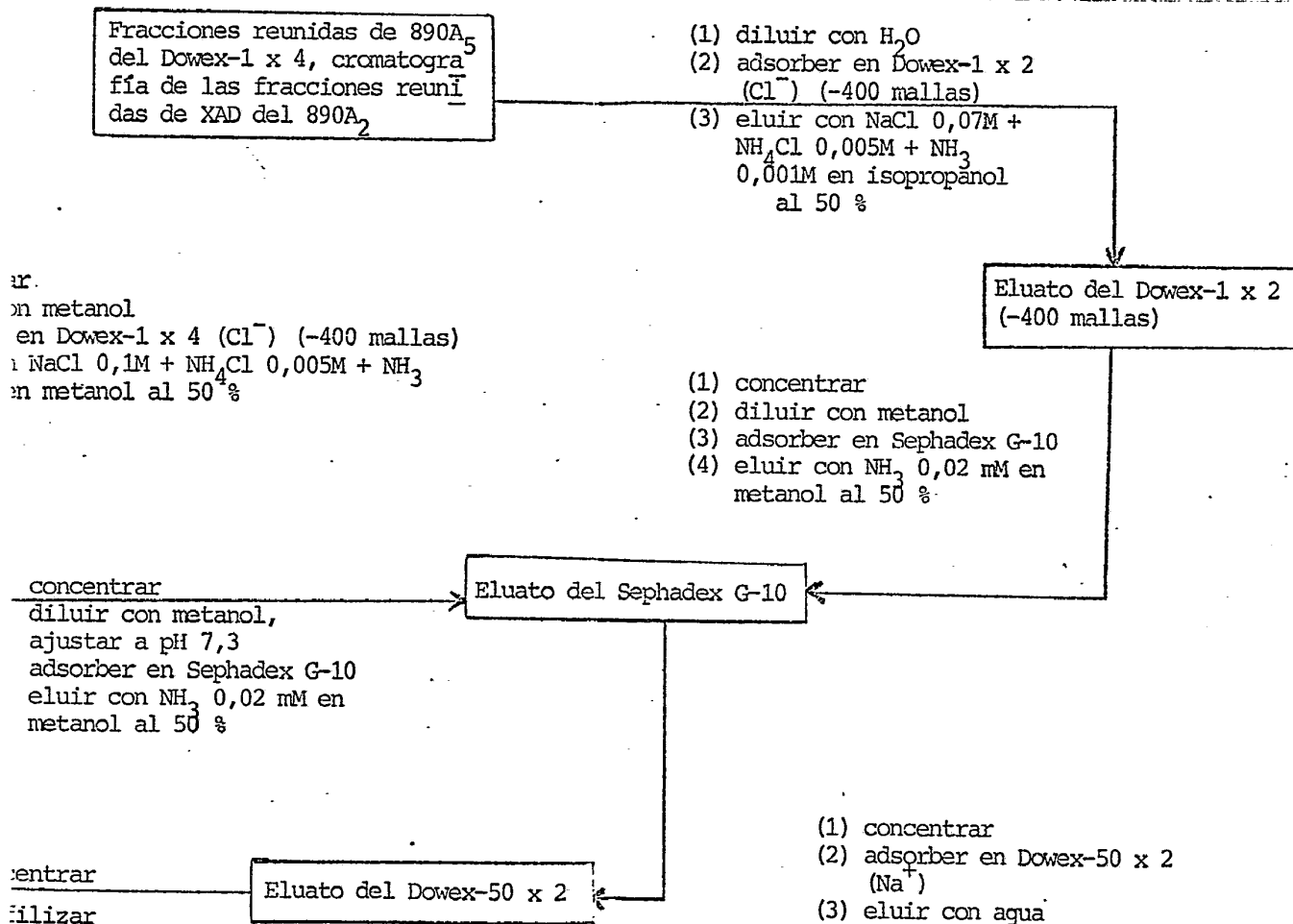


FIGURA 2

a del proceso de purificación del antibiótico 890A₅



1 PROCEDIMIENTOS DE ANALISIS PARA LOS ANTIBIOTICOS 890A₂ y 890A₅

I. Bioanálisis

5 Se emplea el método de difusión en disco-placa de agar, utilizando Vibrio percolans ATCC 8461 o Salmonella gallinarum MB-1287 como organismo de ensayo. Se utiliza como patrón una muestra purificada de antibiótico 890A₁. El antibiótico 890A₁ se prepara siguiendo el procedimiento indicado en el Ejemplo 5.

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

15 Un cultivo liofilizado de Vibrio percolans ATCC 8461 se suspende en 15 ml de un medio esterilizado que contiene 8 g/litro de caldo nutritivo Difco y 2 g/litro de extracto de levadura en agua destilada, "caldo nutritivo-extracto de levadura" (denominado en lo que sigue CNEL). 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 en CNEL y los tubos inoculados se incuban durante la noche a 28°C y después se
20 mantienen en un frigorífico.

25 Los tubos inclinados refrigerados, preparados a partir de un sólo cultivo liofilizado, se utilizan durante hasta 4 semanas a partir de su preparación, como sigue: 4 ml de inóculum del tubo inclinado se dispersan en 50 ml de CNEL 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 que produce una transmitancia del 50% a 660 nm. Se agregan 33,2 ml de este cultivo diluido a 1 litro de CNEL que contiene 15 g de agar y se mantiene a 46°C.
30 El medio inoculado que contiene agar se vierte en placas Petri

1 de plástico de 100 x 15 mm, a razón de 5 ml por placa, se
enfria y se mantiene a 2-4°C durante hasta 5 días, antes de
utilizarlo.

5 Las placas que contienen Salmonella gallinarum NB-1287
se preparan como sigue:

10 Se abre un tubo sellado que contienen células de
Salmonella gallinarum MB-1287 en leche descremada, que han
sido congeladas y liofilizadas y después cerradas hermética-
mente a vacío y se inocula en 15 ml de caldo de infusión de
cerebro-corazón. Las células se dejan crecer sin sacudir a
37°C durante una noche y el cultivo se inocula sobre tubos
15 inclinados de 0,8 % de caldo nutritivo BBL + 0,2 % de extrac-
to de levadura Difco + 1,5 % de agar. Después de cultivar du-
rante la noche a 37°C, se transfieren 4 ml del cultivo del
tubo inclinado a un matraz que contienen 0,8 % de caldo nu-
tritivo + 0,2 % de extracto de levadura. El matraz se sacude
durante la noche y 20 ml de este cultivo se inoculan en 1 li-
tro de 0,8 % de caldo nutritivo + 0,2 % de extracto de leva-
dura + 1,5 % de agar, que ha sido esterilizado y enfriado a
20 48°C. El agar CNEL inoculado se vierte inmediatamente en pla-
cas Petri de plástico de 100 x 15 mm, a razón de 5 ml por pla-
ca y las placas se mantienen a 2-4°C hasta que se utilizan.

25 Unos discos de papel de filtro de 0,5" (12,7 mm) de
diámetro se sumergen en la solución que ha de ser analizada
y se colocan sobre el agar. Alternativamente, los discos pue-
den ser cargados pipeteando 0,1 ml de la solución sobre un
disco seco y después colocando el disco sobre el agar. Se mi-
de el diámetro de la zona de inhibición después de una incuba-
ción apropiada (9-18 horas a 37°C para Salmonella gallinarum
30 MB-1287 o 12-24 horas a 25°C para Vibrio percolans ATCC 8461).

1 Si es necesario, se preparan diluciones de las soluciones que han de ser analizadas en tampón de fosfato potásico 0,05M, pH 7,4, "tampón de fosfato potásico" (denominado en lo que sigue TPK) o en agua desionizada.

5 El cálculo de las potencias se realiza como sigue. Se determina una pendiente midiendo los diámetros de las zonas de una solución de antibiótico 890A₂ u 890A₅ y de una dilución a cuatro veces (en TPK) de esta solución. Se analizan dos discos de cada concentración sobre una sola placa y se
10 determina el tamaño medio de la zona a cada concentración. La pendiente es igual a la mitad de la diferencia de los tamaños medios de zonas. Entonces se calculan las potencias mediante la siguiente fórmula:

$$15 \text{Potencia (Unidades/ml)} = (\text{Potencia del patrón}) \times \text{Dilución} \times 10^{\frac{(D-D_s) \log 2}{\text{pendiente}}}$$

donde D es el diámetro medio de las zonas formadas por el producto desconocido, D_s es el diámetro de las zonas patrón y "Dilución" es el grado al que se diluye el producto desconocido antes de su análisis. Si no se utiliza ningún patrón, se supone que D_s es 25 mm y la (Potencia del patrón) se toma como 1 unidad/ml, cuando se mide sobre Vibrio percolans ATCC 8461. Se define el antibiótico 890A₁ como el que presenta una potencia de 250 unidades por unidad de absorbancia extingüible por hidroxilamina a 300 nm, cuando se utiliza como patrón.

25 Para los análisis sobre placas de Salmonella callinarum MB-1287, se determina una pendiente de la misma forma que sobre placas de Vibrio percolans ATCC 8461. Cuando no se utiliza ningún patrón, solamente se calculan las potencias relativas. Si no se mide ninguna pendiente, se supone un valor
30 de 2,3 mm. El cálculo de las potencias se realiza igual que

1 en el caso del análisis con Vibrio percolans ATCC 8461. Si
no se utiliza ningún patrón de 890A₁, puede emplearse un control
de penicilina G a 250 µg/ml para comprobar que la sensibilidad
de los organismos se encuentra dentro de los límites
5 normales.

II. Procedimiento de análisis para determinar las "Unidades
de análisis de 890"

Se emplea un método convencional de difusión en disco-
placa de agar utilizando Vibrio percolans ATCC 8461 como
10 organismo de ensayo. Como patrón se utiliza cefaloridina.
Las placas que contienen Vibrio percolans ATCC 8461 se pre-
paran como sigue. Se incuba un cultivo de Vibrio percolans
ATCC 8461 en caldo nutritivo-extracto de levadura durante la
15 noche, en un sacudidor rotatorio a 28°C y después se diluye
hasta una densidad del 60 % de transmitancia a 660 nm. Se
agregan 33,2 ml de este cultivo diluido a 1 litro de un me-
dio constituido por agar nutritivo más 0,2 % de extracto de
levadura, mantenido a 46°C. El medio inoculado que contiene
20 agar se vierte en placas Petri de plástico de 100 x 15 mm,
a razón de 10 ml por placa, se enfría y se mantiene a 2-4°C
durante hasta 5 días antes de su uso.

Se determina la concentración de cefaloridina que es
equivalente a 1 unidad/ml de 890A por análisis sobre placas
preparadas como se ha descrito, pero conteniendo 5 ml de me-
25 dio inoculado por placa, como sigue. Cuatro concentraciones
de cefaloridina constituyen el patrón - 3,12, 6,25, 12,5 y
25 mcg/ml, utilizándose como solución de referencia la de
12,5 mcg/ml. Los diámetros de las zonas sobre una placa de
30 5 ml para el patrón son los siguientes:

| | <u>Concentración</u> (mcg/ml) | <u>Diámetro de la</u> <u>zona (mm)</u> |
|---|----------------------------------|---|
| 1 | 3,12 | 16,8 |
| | 6,25 | 22,3 |
| | 12,5 | 25,0 |
| 5 | 25 | 29,6 |

Una unidad se define como la cantidad de antibiótico por mililitro que produce una zona de inhibición de 25 mm sobre una placa de 5 ml, como se ha descrito en la sección I anterior. Por lo tanto, en este análisis, una concentración de 12,5 mcg/ml de cefaloridina se considera equivalente a 1 unidad de 890A por mililitro. Como la pendiente de la línea para la cefaloridina es 4,0, los cálculos de la potencia de una muestra se realizan utilizando una pendiente de 4,0.

15 III. Reacción con hidroxilamina

Los dos antibióticos 890A₂ y 890A₅ reaccionan con la hidroxilamina y producen una sustancia que disminuye considerablemente la absorbancia a 308 nm. Esto proporciona la base para un análisis cuantitativo de los antibióticos 890A₂ y 890A₅.

20 La solución que ha de ser analizada se lleva a 0,05M en fosfato potásico, pH 7,4, por adición de 1/20 volúmenes de una solución que contiene K₂HPO₄ 0,8M y KH₂PO₄ 0,2M. Después se añaden 0,01 volúmenes de hidrocloreuro de hidroxilamina 1M y se mide la absorbancia a 308 nm a intervalos de medio a dos minutos. La reacción se lleva a cabo a la temperatura ambiente. Se supone una cinética de primer orden y se calcula la vida media a partir de la reducción de absorbancia durante los 10 primeros minutos. A partir de esta vi-

25

30

1 da media se estima el tiempo más allá del cual ya no se ob-
servaría ninguna disminución de la absorbancia y se prosiguen las observaciones más allá de ese tiempo. Si no se observa ninguna nueva reducción pasado ese tiempo, se toma la
5 disminución total de la absorbancia (corrigiendo el efecto de dilución y la absorbancia de la hidroxilamina) como la "absorbancia extingible por hidroxilamina a 308 nm (AEHA₃₀₈)".
Si se observa una reducción de la absorbancia más allá de este tiempo, se calcula la velocidad de disminución de la
10 absorbancia de fondo y la disminución observada a ese tiempo se corrige teniendo en cuenta la disminución del fondo, suponiendo que la disminución del fondo es lineal con el tiempo. Después el valor corregido se registra como la AEHA₃₀₈.

15 El número de unidades AEHA₃₀₈ es igual a la AEHA₃₀₈ multiplicada por el volumen en mililitros.

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 resultará evidente al que posee una experiencia normal en este
20 campo que esta invención comprende los productos funcionalmente equivalentes y los métodos para su preparación. Por lo tanto, cualquier modificación de los procedimientos aquí descritos que dé lugar a la formación de los productos de
25 esta invención debe considerarse como constitutiva de un método análogo. Los procedimientos descritos son susceptibles de amplias variaciones y modificaciones y cualquier desviación o ampliación pequeña se considera dentro del alcance del experto y dentro de los límites de esta invención.
30

1

EJEMPLO 1

Producción de una mezcla que contiene antibióticos 890A₂ y 890A₅

5

Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado de Streptomyces flavogriseus MA-4434 y el contenido se suspende en un tubo que contiene 0,8 ml de una solución estéril de sales Davis con la siguiente composición:

Sales Davis

10

| | |
|---|---------|
| Citrato sódico | 0,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 7,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 3,0 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

15

Esta suspensión se utiliza para inocular 4 tubos inclinados de Medio A estéril de la siguiente composición:

Medio A

20

| | |
|---|----------|
| Dextrosa | 10,0 g |
| Peptona | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 3,0 g |
| NaCl | 12,705 g |
| KCl | 0,72 g |
| FeSO ₄ .(NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O | 0,0351 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 5,32 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,728 g |
| Agua destilada | 1000 ml |
| pH 7,4 (antes de la esterilización) | |
| Agar | 25,0 g |

25

30

Los tubos inoculados se incuban durante una semana a 27-28°C y después se mantienen a 4-6°C hasta que se utilizan

1 10 días más tarde. Se utiliza la mitad del crecimiento superficial de uno de estos tubos inclinados para inocular unos Erlenmeyers de 250 ml provistos de tabiques, que contienen 50 ml de Medio B de la siguiente composición:

5

Medio B

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Autolizado de levadura (+Ardamine) | 10,0 g |
| Glucosa | 10,0 g |
| Tampón de fosfato* | 2,0 ml |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 50 mg |
| Agua destilada | 1000 ml |

10

pH: ajustado a 6,5 con HCl o NaOH.

+

Ardamine: Yeast Products Corporation.

* Solución tampón de fosfato

15

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

20

Se inoculan 3 matraces de siembra para obtener inóculum suficiente para los 12 matraces de producción de 2 litros fermentados en este lote. Los matraces de siembra se sacuden durante un día a 28° en un sacudidor a 220 rpm (recorrido: 2", 5 cm). Se sacan los matraces del sacudidor y se mantienen durante un día a 4°C. El contenido de estos matraces de siembra se utiliza para inocular 12 Erlenmeyers de producción de 2 litros, sin tabiques (7 ml de inóculum por matraz), que contienen 250 ml del Medio C de producción, de la siguiente composición:

25

Medio C

| | |
|-------------------|--------|
| Pasta de tomate | 20,0 g |
| Levadura primaria | 10,0 g |

30

1 después los antibióticos 890A₂ y 890A₅ se eluyen con 90 %
(en volumen) de metanol, 3 % (en peso/volumen) de cloruro
amónico, 10 % de agua (en volumen) conteniendo 10 µg/ml de
5 ácido (etilendinitrilo)tetraacético, recogiendo 5 fraccio-
nes de 75 ml. Las fracciones se analizan frente a Vibrio
percolans ATCC 8461 y los resultados están tabulados a con-
tinuación como porcentaje de la bioactividad inicial:

| <u>Fracción</u> | <u>Recuperación</u> |
|---|---------------------|
| Alimentación | 100 % |
| Líquido agotado | 0 |
| Lavado de desplazamiento con agua | 1 % |
| Fracciones 1 a 3 de los elua tos MeOH/NH ₄ Cl | 24 % |

15 EJEMPLO 2

Producción de antibiótico 890A₂ en matraces sacudidos

Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado
de Streptomyces flavogriseus MA-4434 y el contenido se sus-
pende en un tubo que contiene 0,8 ml de sales Davis estéri-
20 les de la siguiente composición:

Sales Davis

| | |
|---|---------|
| Citrato sódico | 0,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 7,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 3,0 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

25 Esta suspensión se utiliza para inocular 4 tubos incli-
nados de Medio A estéril de la siguiente composición:

30

1

Medio A

| | |
|-------------------|---------|
| Glicerol | 20,0 g |
| Levadura primaria | 5,0 g |
| Harina de pescado | 15,0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |
| Agar | 20,0 g |

5

pH: ajustado a 7,2 con NaOH.

10

Los tubos inclinados inoculados se incuban durante una semana a 27-28°C y después se mantienen a 4-6°C hasta que se utilizan (no más de 21 días).

Se utiliza un tercio del cultivo de un tubo inclinado para inocular un Erlenmeyer de 250 ml provisto de tabiques. Se emplea un total de 4 tubos inclinados para inocular 12 matraces. Cada matraz contiene 50 ml de Medio B de la siguiente composición:

15

Medio B

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Autolizado de levadura (+Ardamine) | 10,0 g |
| Glucosa | 10,0 g |
| Tampón de fosfato* | 2,0 ml |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 50,0 mg |
| Agua destilada | 1000 ml |

20

pH: ajustado a 6,5 con HCl o NaOH.

+

Ardamine: Yeast Products Corporation.

25

*Solución tampón de fosfato

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

30

Los matraces de siembra se sacuden durante un día a 27-28°C en un sacudidor a 220 rpm (recorrido: 2", 5 cm).

1 Los matraces y su contenido se mantienen estacionarios durante un día a 4°C.

5 Se inoculan 44 Erlenmeyers de producción de 2 litros, conteniendo cada uno de ellos 200 ml de Medio C, con 8 ml por matraz del cultivo de los matraces de siembra. El Medio C tiene la siguiente composición:

Medio C

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Pasta de tomate | 20,0 g |
| Levadura primaria | 10,0 g |
| Dextrina (Amidex) | 20,0 g |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 5,0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |
| pH: ajustado a 7,2-7,4 con NaOH. | |

15 Después de la inoculación, los matraces de producción se incuban a 24°C, agitando en un sacudidor a 212 rpm (recorrido: 2", 5 cm), durante 4 días y 5 horas. Se cosechan los matraces y se analiza su actividad utilizando placas de análisis patrón de Salmonella gallinarum MB-1287 y Vibrio percolans ATCC 8461, empleando discos de análisis de 0,5" (12,7 mm) sumergidos en las muestras de caldo centrifugado. Las muestras se diluyen con tampón de fosfato 0,02M, pH 7,0, cuando sea necesario. Los resultados están tabulados a continuación:

| | | |
|----|---|-----|
| 25 | Edad de la cosecha, horas | 101 |
| | pH | 7,2 |
| | <u>Salmonella gallinarum</u> (mm de la zona) | 35 |
| | <u>Vibrio percolans</u> , dilución 1/10 (mm de la zona) | 25 |
| | Unidades de análisis de 890 | 121 |

30 El total de 7,0 litros de caldo completo obtenido en es-

1 ta fermentación se enfría a 3°C y se centrifuga en porciones de 200 ml a 9000 rpm, durante 15 minutos cada una. A los líquidos que sobrenadan combinados se agregan 1,7 ml de EDTA neutro 0,1M y el lote se mantiene a 3°C.

5 Se repite la fermentación anterior en condiciones idénticas, a excepción de que los 44 Erlenmeyers de producción de 2 litros se inoculan con 7 ml por matraz de cultivo de los matraces de siembra. El pH y los resultados del análisis están tabulados a continuación:

| | | |
|----|---|------|
| 10 | Edad de la cosecha, horas | 101 |
| | pH | 7,3 |
| | <u>Salmonella gallinarum</u> (mm de la zona) | 38 |
| | <u>Vibrio percolans</u> , dilución 1/10 (mm de la zona) | 27 |
| 15 | Unidades de análisis de 890 | 92,8 |

15 El total de 7,4 litros de caldo completo obtenido en esta fermentación se enfría a 3°C y se centrifugan porciones de 200 ml a 9000 rpm, durante 15 minutos cada una. A los líquidos que sobrenadan combinados se agregan 1,8 ml de EDTA neutro 0,1M. Los líquidos sobrenadantes de los caldos centrifugados resultantes de las dos fermentaciones anteriores de este ejemplo se combinan para dar un volumen total de 13 litros y una potencia de 80 unidades/ml por análisis sobre Vibrio percolans ATCC 8461.

25 Los líquidos sobrenadantes combinados se pasan por una columna de Dowex-1 x 2 (Cl⁻), 50-100 mallas, con unas dimensiones del lecho de 4,7 x 50 cm, a un caudal de 60 ml por minuto. La columna se lava con 1 litro de agua desionizada y se eluye con 5 litros de solución de NaCl al 5 % (peso/volumen) conteniendo tampón de Tris-HCl 0,01M, pH 7,0 y EDTA

30

1 neutro 25 μ M, a un caudal de 50 ml. por minuto.

5 La columna se lava con 500 ml de agua desionizada y los antibióticos 890A₂ y 890A₅ se eluyen con 2 litros de NaCl al 3 % + Tris-HCl 0,01M, pH 7,0, + EDTA neutro 25 μ M en metanol al 50 %, a un caudal de 40 ml/minuto. Se recogen fracciones de 220 ml.

10 La actividad antibiótica, determinada por análisis sobre Salmonella gallinarum MB-1287, aparece en las fracciones 4 a 8, con un máximo en la fracción 5. Las fracciones 4 a 8 contienen un 9 % de la actividad inicial presente en el caldo.

15 Se combinan las fracciones 4 a 7, se concentran hasta 150 ml por evaporación rotatoria a presión reducida y se diluyen hasta 350 ml por adición de 200 ml de agua desionizada. La mezcla se aplica a una columna de XAD-2 (5 x 25 cm), que ha sido lavada previamente con 3 litros de acetona al 60 % (en volumen), agua desionizada y NaCl al 5 % (en peso/volumen), respectivamente. La columna se eluye con 500 ml de agua desionizada a 20 ml/minuto, seguidos de 500 ml de acetona acuosa al 60 % (en volumen). Se recogen fracciones de 160 ml cada una. La actividad antibiótica, determinada por análisis sobre Salmonella gallinarum MB-1287, aparece en las fracciones 1 a 5, con un máximo en las fracciones 3 y 4.

25 La fracción 4, que es la primera fracción que contiene acetona, se concentra hasta 10 ml bajo presión reducida y se diluye con 90 ml de agua desionizada. Esta muestra se aplica a una columna de XAD-2 (5 x 25 cm), que ha sido lavada previamente con 3 litros de acetona al 60 % (en volumen), agua desionizada y NaCl al 5 % (en peso/volumen), respecti-

30

1 vamente. La columna se eluye con agua desionizada a un caudal de 20 ml por minuto. Se recogen fracciones desde 140 hasta 190 ml. La actividad antibiótica, determinada por análisis sobre Salmonella gallinarum MB-1287, aparece en las fracciones 2 a 7 con un máximo en la fracción 4. Se combinan las fracciones 3, 4 y 5 y se agregan a la fracción 3 de la columna de XAD descrita en el párrafo anterior. Las fracciones combinadas contienen 26.400 unidades de bioanálisis, determinadas por análisis sobre Vibrio percolans ATCC 8461, igual al 2,5 % de la actividad inicial.

5
10
15
20
La fracción 3 de XAD-2, de la primera columna de XAD, y las fracciones 3, 4 y 5 de la segunda columna de XAD combinadas se concentran a presión reducida hasta 25 ml y después se añaden 25 ml de agua desionizada y 50 ml de metanol. La solución metanólica se adsorbe en una columna (2,15 x 26,4 cm) de Dowex-1 x 4 (Cl⁻), -400 mallas, que ha sido equilibrada con metanol acuoso al 50 % (en volumen). La columna se eluye con 1,44 litros de NaCl 0,07M + NH₄Cl 0,005M + NH₃ 0,0001M en metanol al 50 %, a un caudal de 2 ml por minuto. Se recogen fracciones de 12,1 ml. Se prosigue la elución con 2 litros de NaCl 0,08M + NH₄Cl 0,005M + NH₃ 0,0001M en metanol al 50 %, recogiendo fracciones de 11,7 ml cada una.

25
30
En las fracciones 138 a 162 aparece un pico de absorbanza UV a 300 nm, con un máximo en las fracciones 149-150. Se observa que la absorción a 305 nm es escindible hasta un 77 % por reacción con L-cisteína a pH neutro. Se reúnen las fracciones 145 a 155, que contienen el antibiótico 890A₂, y se concentran hasta 2,4 ml, conteniendo un total de 70,5 unidades A₃₀₀.

1 La muestra concentrada se aplica a una columna (2,2 x
70 cm) de Bio-Gel P-2, 200-400 mallas, que ha sido lavada
con 1 litro de agua desionizada. La muestra se deja drenar
5 hasta el nivel del lecho y el residuo se lava dos veces con
1 ml cada vez de agua desionizada. La columna se eluye con
agua desionizada a un caudal de 1 ml por minuto. Se recogen
fracciones de 2 a 3,5 ml.

10 El pico principal de absorbancia a 308 nm aparece
en las fracciones 64 a 72, inmediatamente precedentes y no
completamente separadas del cloruro sódico. Se combinan las
fracciones 66 y 67, que contienen 27 unidades de absorción
del antibiótico 890A₂ a 308 nm y desde 29 a 43 mg de NaCl
(estimado por conductividad). Estas fracciones combinadas
15 se concentran hasta 1,5 ml bajo presión reducida y se lio-
filizan, dando 43,7 mg de sólidos.

EJEMPLO 3

Preparación de los antibióticos 890A₂ y 890A₅

20 Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado
de Streptomyces flavogriseus MA-4434 y su contenido se sus-
pende en un tubo que contiene 0,8 ml de sales Davis estériles
con la siguiente composición:

Sales Davis

| | | |
|----|---|---------|
| | Citrato sódico | 0,5 g |
| 25 | K ₂ HPO ₄ | 7,0 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 3,0 g |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,0 g |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,1 g |
| | Agua destilada | 1000 ml |

30 Esta suspensión se utiliza para inocular 4 tubos incli-
nados de Medio A de la siguiente composición:

1

Medio A

Glicerol 20,0 g

Levadura primaria 5,0 g

Harina de pescado 15,0 g

5

Agua destilada 1000 ml

Agar 20,0 g

pH: ajustado a 7,2 con NaOH.

Los tubos inoculados se incuban durante una semana a 27-28°C y después se mantienen a 4-6°C hasta que se utilizan (no más de 21 días).

10

Se transfieren asépticamente a uno de estos tubos inclinados 10 ml de Medio B de la siguiente composición:

Medio B

15

Autólizado de levadura
(⁺ Ardamine) 10,0 g

Glucosa 10,0 g

Tampón de fosfato* 2,0 ml

MgSO₄·7H₂O 50 mg

Agua destilada 1000 ml

20

pH: ajustado a 6,5 con HCl o NaOH.

+

Ardamine: Yeast Products Corporation.

* Solución tampón de fosfato

KH₂PO₄ 91,0 g

Na₂HPO₄ 95,0 g

25

Agua destilada 1000 ml

30

se rascan para pasar a la 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 tabique, que contienen 500 ml de Medio B. Este matraz de siembra se sacude a 28°C en un sacudidor a 160 rpm (recorrido: 2", 5 cm) du

1 rante 36 horas, al cabo de las cuales el crecimiento es satisfactorio.

5 El cultivo de este matraz de siembra se utiliza para inocular un tanque de siembra de acero inoxidable de 189 litros, que contiene 160 litros de Medio B. Este tanque opera a 28°C, utilizando una velocidad de agitación de 150 rpm y un caudal de aire de 3 pies³ (84 litros) por minuto, durante 24 horas. Se utiliza el antiespumante Poliglicol 2000 (Dow Chemical Corp.) en la medida necesaria pero sin pasar del 0,1 %. Se realizan las siguientes determinaciones del pH:

| <u>Edad, horas</u> | <u>0</u> | <u>12</u> |
|--------------------|----------|-----------|
| pH | 6,3 | 6,35 |

15 Se emplean 43 litros del cultivo de este tanque de siembra para inocular un fermentador de acero inoxidable de 756 litros que contiene 467 litros de Medio C, donde el Medio C tiene la siguiente composición:

Medio C

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Pasta de tomate | 20,0 g |
| Levadura primaria | 10,0 g |
| Dextrina (Amidex) | 20,0 g |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 5,0 mg |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH: ajustado a 7,2-7,4 con NaOH.

25 Este tanque opera a 25°C empleando una velocidad de agitación de 146 rpm y un caudal de aire de 9 pies³ (254 litros) por minuto, durante 92 horas. Si es necesario se añade más antiespumante Poliglicol 2000, sin pasar del 0,1 %. Los análisis antibacterianos se realizan sobre Salmonella
30 gallinarum MB 1287 y Vibrio percolans ATCC 8461 y se obtienen

1 los siguientes resultados:

| | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|------|------|
| Edad, horas | 0 | 12 | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 92 |
| pH | 6,6 | 6,7 | 6,65 | 6,3 | 6,0 | 6,4 | 6,15 | 6,5 | 6,5 |
| MB 1287, mm | - | - | - | S | - | 19 | 26 | 28 | 32 |
| ATCC 8461, mm(1-10)- | - | - | - | S | - | 21 | 24 | 26 | 30 |
| Unidades 890A/ml | | | | NA | NA | 6,8 | 13,5 | 24,9 | 24,3 |

5 Las unidades 890A/ml se determinan como se ha indicado en la sección titulada "II. Procedimiento de análisis para determinar las "Unidades de Análisis de 890".

10 Se enfrían 125 galones (473 litros) de caldo a 5°C y se centrifugan en una centrífuga Titan P-9. Se agregan 50 libras (22,7 kg) de Celite a los 100 galones (378,5 litros) de líquido sobrenadante y la suspensión se filtra por un filtro prensa Shriver de 18" (45,7cm). Los 91 galones (344,5 litros) de filtrado se adsorben en una columna que contiene 7 galones (26,5 litros) de Dowex-1 x 2 (Cl⁻), 50-100 mallas, y la columna se lava con 10 galones (37,8 litros) de agua desionizada, seguido de 30 galones (113,6 litros) de NaCl al 5 % + tampón Tris-HCl 0,01M, pH 7,0 + EDTA neutro 25 µM en agua desionizada. Después de un lavado adicional con 5 galones (18,9 litros) de agua desionizada, los antibióticos 890A₂ y 890A₅ se eluyen con 25 galones (94,6 litros) de NaCl al 3 % + tampón Tris-HCl 0,01M, pH 7,0 + EDTA neutro 25 µM en metanol acuoso al 50 % (en volumen). Se recogen fracciones de 5 galones (18,9 litros).

25 La actividad antibiótica, determinada por análisis frente a Salmonella gallinarum MB 1287, aparece en las fracciones 1 a 5, con un máximo en la fracción 3. Se combinan las fracciones 2 y 3, que contienen 10,9 % de la actividad del caldo aplicado y se concentran hasta 2 galones (7,6 litros) a pre-

30

1 sión reducida. La muestra concentrada se diluye con 8 galones (30,3 litros) de agua desionizada y de nuevo se concentra hasta 2 galones (7,6 litros) a presión reducida, para eliminar el metanol residual.

5 Los 2 galones (7,6 litros) de concentrado se aplican a una columna que contiene 10 galones (37,8 litros) de XAD-2 que ha sido previamente lavado con 50 galones (189 litros) de acetona acuosa al 60 %, seguido de 50 galones (189 litros) de agua desionizada y 50 galones (189 litros) de NaCl al 5%.
10 La columna se eluye con 37,5 galones (141,2 litros) de agua desionizada. Se recogen 3 fracciones de 2,5 galones (9,5 litros), seguidas de 6 fracciones de 5 galones (18,9 litros). La actividad, determinada por análisis sobre placas de Salmonella gallinarum MB 1287, aparece en las fracciones 1 a
15 6, con un pico de potencia en la fracción 2. Se combinan las fracciones 2 a 5, que contienen el 64 % de la actividad aplicada a la columna de XAD o 520.000 unidades.

20 Las fracciones 2 a 5 se concentran hasta 120 ml por evaporación a presión reducida. El pH se ajusta a 6,5 y el concentrado se aplica a una columna (7 x 50 cm) de XAD-2 que ha sido lavada con 8 litros de acetona acuosa al 60 %, seguidos de 4 litros de agua desionizada y 8 litros de NaCl al 5 % en agua desionizada. La muestra se drena hasta el nivel del lecho y la columna se lava con 3 porciones de 20 ml
25 de agua desionizada, drenando hasta el nivel del lecho cada vez. El antibiótico se eluye con 6 litros de agua desionizada a un caudal de 40 ml por minuto. Se recogen 8 fracciones de 200 ml seguidas de 11 fracciones de 400 ml. La actividad antibiótica, determinada por análisis sobre placa de
30 Salmonella gallinarum MB 1287, aparece en las fracciones 3

1 a 18, con un pico de actividad en la fracción 8.

5 Se combinan las fracciones 8 a 12, con las máximas relaciones de bioactividad/A₂₂₀ y con 225.000 unidades de bioactividad, determinado por análisis frente a Salmonella gallinarum MB 1287, para su posterior transformación.

10 Las fracciones combinadas se concentran a presión reducida hasta 50 ml y se añaden 50 ml de metanol. La muestra se aplica a una columna de Dowex-1 x 4 (Cl⁻), -400 mallas, dimensiones del lecho 2,2 x 40 cm, que ha sido previamente lavada con metanol al 50 %. La columna se eluye con 2 litros de NaCl 0,07M + NH₄Cl 0,005M + NH₄ 0,0001M en metanol acuoso al 50 %, a un caudal de 2 ml por minuto. Se recogen fracciones de 12 ml.

15 En el efluente se observan dos picos desiguales de bioactividad, determinados por análisis frente a Salmonella gallinarum MB 1287, correspondientes a dos picos de material con un máximo de absorción a 308 nm. La mayor parte de la absorbancia a 308 nm en ambos picos es escindible por reacción con hidroxilamina.

20 El primer pico, que contiene el antibiótico 890A₂, aparece en las fracciones 98 a 136 y el segundo pico, que contiene el antibiótico 890A₅, aparece en las fracciones 136 a 158. Se combinan las fracciones 112 a 130 para dar el combinado de 890A₂ de Dowex y las fracciones 138 a 148 para dar el combinado de 890A₅ de Dowex. El 890A₂ se purifica de nuevo por desalación sobre Sephadex G-10.

25
30 Se concentran a presión reducida las fracciones 112-130 que contienen el antibiótico 890A₂, hasta 5,5 ml y el concentrado se aplica a una columna (2,15 x 70 cm) de Sepha-

1 dex G-10 y se eluye con agua desionizada a un caudal de 1 ml por minuto. Se recogen fracciones de 2,85 ml cada una. La bioactividad determinada por análisis frente a Salmonella gallinarum MB 1287 aparece en las fracciones 60 a 98. Se
5 reunen para su liofilización las fracciones 78 a 90 con las relaciones máximas A_{308}/A_{260} . El pH de las fracciones combinadas es 4,1 y se ajusta a 7,8 por adición de 8 μ l de amoniac 1M. El combinado contiene 52 unidades A_{308} con una relación A_{308}/A_{260} de 0,76, que indica que se ha producido
10 una degradación sustancial del antibiótico durante este proceso.

15 Las fracciones 78 a 90 combinadas se concentran hasta 1,69 ml a presión reducida. Se toman dos muestras de 0,1 ml y se liofilizan independientemente en pequeños viales cónicos de reacción de vidrio. El resto se liofiliza en un vial de vidrio de tapa roscada, de 14 ml, dando 1,29 mg de sólidos que contienen el 890A₂.

EJEMPLO 4

Preparación de 890A₅

20 Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado de Streptomyces flavogriseus MA-4434 y el contenido se suspende en un tubo que contiene 0,8 ml de sales Davis estériles de la siguiente composición:

Sales Davis

| | | |
|----|----------------------|---------|
| 25 | Citrato sódico | 0,5 g |
| | K_2HPO_4 | 7,0 g |
| | KH_2PO_4 | 3,0 g |
| | $(NH_4)_2SO_4$ | 1,0 g |
| 30 | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,1 g |
| | Agua destilada | 1000 ml |

1

Esta suspensión se utiliza para inocular 4 tubos inclinados de Medio A de la siguiente composición:

Medio A

5

| | |
|-------------------|---------|
| Glicerol | 20,0 g |
| Levadura primaria | 5,0 g |
| Harina de pescado | 15,0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |
| Agar | 20,0 g |

pH: ajustado a 7,2 con NaOH.

10

Los tubos inoculados se incuban durante una semana a 27-28°C y después se mantienen a 4-6°C hasta que se utilizan (no más de 21 días).

Se transfieren asépticamente a uno de estos tubos inclinados 10 ml de Medio B de la siguiente composición:

15

Medio B

20

| | |
|---|---------|
| Autolizado de levadura (⁺ Ardamine) | 10,0 g |
| Glucosa | 10,0 g |
| Tampón de fosfato* | 2,0 ml |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 50 mg |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH: ajustado a 6,5 con HCl o NaOH.

⁺ Ardamine: Yeast Products Corporation.

*Solución tampón de fosfato

25

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

30

se rascan para pasar a la suspensión las esporas y el micelio aéreo y esta suspensión se utiliza para inocular 3 Erlenmeyers de 2 litros, provistos de tabique, conteniendo 500 ml de Medio B, a razón de 3,3 ml/matraz. Estos matraces

1 de siembra se sacuden a 28°C en un sacudidor a 160 rpm (re-
corrido: 2", 5 cm) durante 36 horas, al cabo de las cuales
el crecimiento es satisfactorio.

5 Se utilizan 500 ml del cultivo de estos matraces de
siembra para inocular un tanque de siembra de acero inoxi-
dable de 189 litros, conteniendo 160 litros de Medio B. Es-
te tanque opera a 28°C, con una velocidad de agitación de
150 rpm y un caudal de aire de 3 pies³ (84 litros) por minu-
to, durante 24 horas. Cuando es necesario se utiliza el anti-
10 espumante Poliglicol 2000 (Dow Chemical Corp.) pero sin pa-
sar del 0,1 %. Se realizan las siguientes determinaciones
del pH:

| | | |
|-------------|----------|-----------|
| Edad, horas | <u>0</u> | <u>24</u> |
| pH | 6,1 | 5,6 |

15 Se emplean 43 litros del cultivo de este tanque de
siembra para inocular un fermentador de acero inoxidable
de 756 litros que contiene 460 litros de Medio C, de la
siguiente composición:

| <u>Medio C</u> | |
|--------------------------------------|---------|
| Pasta de tomate | 20,0 g |
| Levadura primaria | 10,0 g |
| Dextrina (Amidex) | 20,0 g |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 5,0 mg |
| Agua destilada | 1000 ml |

25 pH: ajustado a 7,2-7,4 con NaOH

que se ha esterilizado durante 60 minutos a 120°C. Este tan-
que opera a 25°C, con una velocidad de agitación de 160 rpm
y un caudal de aire de 10 pies³ (280 litros) por minuto, du-
rante 144 horas. Se añade cuando sea necesario más antiespu-
30 mante Poliglicol 2000, pero sin pasar del 0,1 %. Los análi-

1 sis antibacterianos se realizan sobre placas de Salmonella gallinarum MB 1287 y Vibrio percolans ATCC 8461, obteniéndose los siguientes resultados:

| | <u>0</u> | <u>24</u> | <u>48</u> | <u>72</u> | <u>96</u> | <u>120</u> | <u>144</u> |
|--------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| 5 Edad, horas | | | | | | | |
| pH | 6,2 | 6,2 | 6,3 | 7,0 | 7,3 | 7,7 | 8,2 |
| MB 1287, mm | - | T | 26,5 | 28 | 33,5 | 32,5 | 31,5 |
| MB 1272, mm (dilución 1-10) | - | - | 21,5 | 26,5 | 35 | 31,5 | 33 |
| Unidades 890A/ml | - | NA | 6,4 | 16,5 | 16,7 | 22,5 | 19,5 |

10 Las unidades 890A/ml se determinan en la forma indicada en la sección titulada "II. Procedimiento de análisis para determinar las unidades de análisis 890".

15 Se enfrían 100 galones (378,5 litros) de caldo a 5°C y se centrifugan en una centrífuga Titan P-9. Se añaden 40 libras (18,1 kg) de Celite a los 75 galones (283,9 litros) de líquido sobrenadante y la suspensión se filtra a través de un filtro prensa Shriver de 18" (45 cm). Los 60 galones (227,1 litros) de filtrado se adsorben en una columna que contiene 7 galones (26,5 litros) de Dowex-1 x 2 (Cl⁻),

20 16-100 mallas y la columna se lava con 10 galones (37,8 litros) de agua desionizada, seguidos de 30 galones (113,6 litros) de NaCl al 5 % + tampón Tris-HCl 0,01M, pH 7,0 + EDTA neutro 25 µM. Después de un lavado adicional con 5 galones (18,9 litros) de agua desionizada, los antibióticos 890A₂ y

25 890A₅ se eluyen con 35 galones (132,5 litros) de NaCl al 3 % + Tris-HCl 0,01M, pH 7,0 + EDTA neutro 25 µM en metanol al 50 %. Se recogen fracciones de 5 galones (18,9 litros) cada una.

30 La bioactividad, determinada por análisis frente a Salmonella gallinarum MB 1287, aparece en las fracciones 1

1 a 7 con un máximo en la fracción 3. Las fracciones 3 a 7,
que contienen el 18 % de la actividad aplicada, se concen-
5 tran a presión reducida hasta 2,5 galones (9,5 litros) y el
concentrado se aplica a una columna que contiene 10 galones
(37,8 litros) de XAD-2 que ha sido previamente lavado con
50 galones (189,3 litros) de acetona acuosa al 60 % (en vo-
lumen), agua desionizada y NaCl al 5 % en agua desionizada,
respectivamente. Los antibióticos 890A₂ y 890A₅ se eluyen
con 35 galones (132,5 litros) de EDTA neutro 25 µM en agua
10 desionizada. Se recoge una fracción de 5 galones (18,9 li-
tros), seguida de 4 fracciones de 2,5 galones (9,5 litros)
y 4 fracciones de 5 galones (18,9 litros). La bioactividad,
determinada por análisis frente a Salmonella gallinarum MB
1287, aparece en las fracciones 3 a 9 con un máximo en la
15 fracción 4.

Se combinan las fracciones 3 a 6, que contienen el
18 % de la actividad del caldo filtrado y se concentran a
presión reducida hasta 122 ml y el concentrado se ajusta
a pH 6,45 por adición de 5 ml de HCl 1M. El concentrado se
20 aplica a una columna (7,9 x 60 cm) de XAD-2 que ha sido
previamente lavada con 16 litros de acetona acuosa al 60 %,
agua desionizada y NaCl al 5 % en agua desionizada, respec-
tivamente. Los antibióticos 890A₂ y 890A₅ se eluyen con 8
litros de agua desionizada a un caudal de 50 ml por minuto.
25 Se recogen fracciones desde 200 hasta 1000 ml.

La bioactividad, determinada por análisis frente a
Salmonella gallinarum MB 1287, aparece en las fracciones 5
a 20, es decir, desde 1900 hasta 7700 ml del volumen eluido.
Los valores A₂₂₀ y AEHA₃₀₄ se miden también sobre las frac-
30 ciones 9 a 20. Las fracciones 9 a 12 contienen 261-286 uni-

1 dades de biopotencia por unidad AEHA₃₀₄ y las fracciones
16 a 20 contienen 23-28 unidades/unidad de AEHA₃₀₄ mientras
que las fracciones 13 a 16 presentan valores intermedios,
poniendo de manifiesto una separación significativa de los
5 antibióticos 890A₂ y 890A₅ en esta columna. Las fracciones
15 a 19, que contienen la mayor parte del 890A₅, se reúnen
para su posterior purificación.

10 Las fracciones 15 a 19 combinadas se concentran a
presión reducida hasta 250 ml. Al concentrado se agregan
250 ml de metanol y la muestra se aplica a un caudal de 2 ml
por minuto a una columna (3,4 x 50 cm) de Dowex-1 x 4 (Cl⁻),
-400 mallas, que ha sido lavada con metanol al 50 %. La co-
luna se eluye con 8 litros de NaCl 0,1M + NH₄Cl 0,005M +
15 NH₃ 0,0001M en metanol al 50 %, a un caudal de 2 ml por mi-
nuto. Se recogen fracciones de 10 ml.

20 El antibiótico 890A₅ eluye en las fracciones 505 a
605, con un pico en la fracción 550. Se reúnen las fraccio-
nes 520 a 580, se toman 300 ml de las fracciones combinadas
y se concentra hasta 4 ml a presión reducida. Al concentra-
do se agregan 6 ml de metanol y 25 µl de NaOH 1M, dando un
pH final de 7,3.

25 El concentrado con el pH ajustado se aplica a una co-
lumna (2,2 x 70 cm) de Sephadex G-10 que ha sido equilibra-
da con NH₃ 0,02 mM en metanol al 50 %. La columna se eluye
con NH₃ 0,02 mM en metanol al 50 %, a un caudal de 1 ml por
minuto.

30 El antibiótico 890A₅ eluye en las fracciones 38 a 88,
con un máximo en las fracciones 39 y 40. Se combinan las
fracciones 40 a 68 y el pH se ajusta desde 6,3 a 6,8 con
NaOH 1M. Las fracciones 40 a 68 combinadas se concentran has-

1 ta 4 ml bajo presión reducida y durante la concentración se añaden 80 μ l de NaOH 1M para mantener el pH entre 7,0 y 7,3. A los 4 ml de concentrado final se agregan 20 μ l de NaOH 1M, llevando el pH a 7,4.

5 El concentrado se purifica de nuevo aplicándolo a una columna (3,4 x 46 cm) de Dowex-50 x 2 (Na^+), 200-400 mallas, que ha sido lavada con 4 litros de NaOH 0,2 mM, seguidos de 800 ml de agua desionizada. El antibiótico se eluye con agua desionizada a un caudal de 4,1 ml por minuto. Se recogen fracciones de 8,2 ml.

10 El antibiótico aparece en las fracciones 22 a 27, con un máximo en la fracción 23. Se reúnen las fracciones 23 a 25 que contienen 152 unidades A_{308} , con una relación A_{308}/A_{260} de 2,00. Las medidas de conductividad indican la presencia de 70 μ moles de NaCl en las fracciones reunidas.

15 Se convierten 4 ml de las fracciones 23-25 combinadas de Dowex-50 en la forma amónica haciéndolas pasar por una columna (0,7 x 12 cm) de Dowex-50 x 2 (NH_4^+), 200-400 mallas, que ha sido lavada con 100 ml de NH_3 0,1 mM, seguidos de 10 ml de agua desionizada. La muestra se eluye con agua desionizada, recogiendo fracciones de 1 a 2 ml. Se combinan todas las fracciones con A_{308} superiores a 1, dando un total de 6 ml con un $A_{308} = 30$. Esta muestra se concentra a presión reducida hasta 0,725 ml y se pipetea independientemente dos partes alícuotas de 50 μ l en dos viales de reacción cónicos de 0,5 ml y se liofilizan.

20 La trimetilsililación del antibiótico 890A₅ produce tres derivados diferentes: derivados di- y tri-trimetilsililados (pesos moleculares 456 y 528, respectivamente) y una pequeña cantidad de un derivado tetra-trimetilsililado de un

30

1 producto hidrolizado (peso molecular 618), donde el anillo de β -lactama está abierto.

Los valores de los fragmentos del espectro de masas más importantes están dados a continuación:

5 derivado di-trimetilsililado: 441, 299, 298 y 84;

derivado tri-trimetilsililado: 513, 371 y 156;

derivado tetra-trimetilsililado (solamente se observa una señal de baja resolución): 618 y 603.

10 Se concentran 18,6 ml de las fracciones 23-25 combinadas de la columna de Dowex-50 hasta 3 ml bajo presión reducida y una parte alícuota de 1,96 ml se congela y liofiliza en un vial de vidrio de 14 ml para dar 2,73 mg de un sólido que contiene una mezcla de antibiótico 890A₅ y cloruro sódico. Como las conductividades de las fracciones 23-25 indican que el 45 % del sólido está constituido por cloruro sódico, puede calcularse una E % de 490 a 308 nm para una muestra exenta de sal de 890A₅ a partir de la E % observada de 272. Los 1,0 ml restantes de los 3,0 ml de concentrado se liofilizan independientemente para su análisis por RMN.

15 20 La siguiente tabla contiene las señales de RMN a 100 MHz de la sal sódica del antibiótico 890A₅ en D₂O, con respecto al patrón interno de DSS; los desplazamientos químicos están dados en ppm y las constantes de acoplamiento en Hz; están indicadas las multiplicidades aparentes.

25 1,29 (d, J = 6,2, $\text{CH}_3-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-\overset{|}{\text{H}}$), 2,05 (s, $\text{CH}_3\overset{|}{\text{C}}=\overset{|}{\text{O}}$), 3,09 (aproximadamente d de d, $-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-\overset{|}{\text{CH}_2}-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-$), 3,41 (d de d, J = 5,0, $\text{>}\overset{|}{\text{CH}}-\overset{|}{\text{C}}=\overset{|}{\text{O}}$), 4,16 (m, $\text{>}\overset{|}{\text{CH}}-\overset{|}{\text{N}}-\text{y } \text{>}\overset{|}{\text{CH}}-\overset{|}{\text{OH}}$), 6,00 y 7,11 (dobletes, J = 13,8, S-CH=CH-N).

30

1

EJEMPLO 5

Producción del antibiótico 690A₁ en matraz sacudido

5

Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado de Streptomyces flavogriseus MA-4600 y el contenido se suspende en un tubo que contiene 1,5 ml de Medio A estéril de la siguiente composición:

Medio A

10

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Extracto de levadura | 10,0 g |
| Glucosa | 10,0 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,05 g |
| *Tampón de fosfato | 2 ml |
| Agua destilada | 1000 ml |

*Solución tampón de fosfato

15

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

20

Esta suspensión se utiliza para inocular un Erlenmeyer de siembra de 250 ml, de triple tabique, conteniendo 54 ml del Medio B de siembra, de la siguiente composición:

Medio B

25

| | |
|--|---------|
| Levadura autolizada (Ardamine ⁺) | 10,0 g |
| Glucosa | 10,0 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,05 g |
| Tampón de fosfato* | 2 ml |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH: ajustado a 6,5 con NaOH

⁺ Ardamine: Yeast Products Corporation

* Solución tampón de fosfato

30

| | |
|---------------------------------|--------|
| KH ₂ PO ₄ | 91,0 g |
|---------------------------------|--------|

| | | |
|---|----------------------------------|---------|
| 1 | Na ₂ HPO ₄ | 95,0 g |
| | Agua destilada | 1000 ml |

El matraz de siembra se tapa con algodón y se sacude durante 30 horas a 28°C ± 1°C en un sacudidor giratorio a 220 rpm (recorrido: 2", 5 cm).

Se inoculan 50 Erlenmeyers de producción sin tabiques, de 250 ml, conteniendo cada uno de ellos 40 ml del Medio C de producción, con 1 ml por matraz del caldo procedente del matraz de siembra. Los matraces de producción se tapan con algodón.

Medio C

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Pasta de tomate | 20,0 g |
| Levadura primaria | 10,0 g |
| Dextrina (Amidex) | 20,0 g |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 5,0 mg |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH: ajustado a 7,2-7,4 con NaOH.

Después de la inoculación, los matraces de producción se incuban a 28 ± 1°C, agitando en un sacudidor giratorio a 220 rpm (recorrido: 2", 5 cm), durante 3 días. En los matraces se determina la actividad frente a placas de análisis patrón de Vibrio percolans ATCC 8461, empleando discos de análisis de 0,5" (12,7 mm) sumergidos en muestras del caldo de fermentación centrifugado. Las muestras se diluyen con tampón de fosfato 0,05M, pH 7,4. Los resultados están tabulados a continuación:

| | |
|--|-------|
| Edad de la cosecha, horas | 72 |
| pH | 6,4 |
| <u>Vibrio percolans</u> (dilución 1/100) | 23 mm |
| Unidades de análisis 890/ml | 103 |

1

Las unidades 890A/ml se determinan en la forma indicada en la sección titulada "II. Procedimiento de análisis para determinar las "Unidades de análisis 890".

5

El caldo completo se centrifuga en porciones de 200 ml en frascos de policarbonato a 900 rpm, durante 15 minutos, para dar 1600 ml de líquidos sobrenadantes combinados con una potencia de 104 unidades/ml. A esta combinación se agregan 0,5 ml de EDTA neutro 0,1M.

10

El caldo centrifugado se adsorbe en una columna de Dowex-1 x 2 (Cl⁻), 50-100 mallas, dimensiones del lecho 3,8 x 22 cm, a un caudal de 6 a 20 ml/minuto. La columna se enjuaga con 100 ml de agua desionizada y se eluye con 1 litro de agua desionizada que contiene 50 g de cloruro sódico, tampón Tris-HCl 0,02M a pH 7,0 y EDTA neutro 25 µM, a un caudal de 6 ml/minuto. Se recogen fracciones de 10 ml.

15

El antibiótico 890A₁ aparece en las fracciones 13 a 81, con un máximo en las fracciones 25 a 33, contando a partir de la primera aplicación del eluato salino. Se combinan las fracciones 24 a 41, que presentan las máximas relaciones de biopotencia/A₂₂₀, para su posterior procesado. Las fracciones combinadas contienen un total de 20.000 unidades o 17 % de la bioactividad aplicada.

20

25

El eluato de la columna de Dowex se concentra hasta 10 ml, se ajusta el pH a 6,5 con ácido clorhídrico diluido y el concentrado se aplica a una columna de XAD-2, dimensiones del lecho 3,3 x 36 cm, que ha sido previamente lavada con 2 litros de acetona acuosa al 60 %, agua desionizada y cloruro sódico al 5 % (en peso/volumen) en agua desionizada, respectivamente. La muestra se eluye con agua desionizada a un caudal de 6 ml/minuto. Se recogen fracciones desde 40 has-

30

1 ta 260 ml.

La actividad antibiótica aparece en las fracciones 6 a 14, que se extienden desde 220 hasta 2560 ml de volumen eluido. El pico se encuentra en las fracciones 9 y 10, que se extienden desde 370 hasta 590 ml del volumen eluido. Las fracciones 9 a 12, que se extienden desde 370 hasta 1060 ml de volumen eluido, presentan las máximas relaciones de $AEHA_{300}/A_{220}$ y se combinan para su posterior procesado. Estas fracciones contienen 36.600 unidades, igual al 126 % de la actividad aplicada aparente.

5

Las fracciones 9 a 12 combinadas se concentran hasta 100 ml y el concentrado se aplica a una columna de Dowex-1 x 4 (Cl^-), -400 mallas, dimensiones del lecho 2,2 x 41 cm, a un caudal de 2 ml/minuto. La columna se lava con 50 ml de agua desionizada y se eluye con 3 litros de $NaCl$ 0,07M + NH_4Cl 0,005M + NH_3 0,0001M en agua desionizada, a un caudal de 2 ml/minuto. Se recogen fracciones de 10,8 ml, empezando a partir de la primera aplicación del eluyente.

10

El pico principal de antibiótico 890A₁ aparece en las fracciones 181 a 217, con un máximo en la fracción 198. Se reúnen las fracciones 186 a 210 que contienen un total de 114 unidades de absorción a 300 nm.

15

Las fracciones combinadas se concentran hasta 4,0 ml y el pH se ajusta a 7,3 por adición de 16 μ l de $NaOH$ 1M. El concentrado se aplica a una columna de Bio-Gel P-2, 200-400 mallas, dimensiones del lecho 2,15 x 70 cm y se lava tres veces con 1 ml cada vez de agua desionizada, eluyendo con agua desionizada a 0,96 ml/minuto. Se recogen fracciones de 3,85 ml.

20

25

30

1 El pico principal de antibiótico 890A₁ aparece en
las fracciones 24 a 44, con un máximo en las fracciones 33
y 34. Las fracciones 27 a 38, con las máximas relaciones
5 A₃₀₀/A₂₄₅, se combinan para su liofilización. Estas fraccio-
nes combinadas contienen un total de 72 unidades A₃₀₀.

10 Para realizar la liofilización, las fracciones com-
binadas se concentran hasta 3,0 ml y el pH del concentrado
se ajusta a 7,5 por adición de 10 μ l de NaOH 0,1M. La mues-
tra se divide en dos porciones de 1,50 ml cada una, que se
congelan rápidamente por separado y se liofilizan en viales
de vidrio de tapa roscada, de 14 ml. Cada muestra contiene
1,73 mg del antibiótico 890A₁, correspondiente a 35,8 unida-
des A₃₀₀.

15 Formulación conteniendo los antibióticos 890A₂ y 890A₅

20 Las composiciones que contienen los antibióticos de
esta invención pueden ser administradas en varias formas de
dosis unitarias, por ejemplo en dosis sólidas o líquidas
ingeribles por vía oral. Es evidente que los antibióticos
890A₂ y 890A₅ pueden ser utilizados independientemente o en
combinación. Las composiciones descritas más adelante son
25 aplicables a los antibióticos 890A₂ y 890A₅, solos y en com-
binación. En general, las cantidades administradas de anti-
biótico 890A₅ serán superiores a las de antibiótico 890A₂
para cualquier situación clínica dada. Las composiciones
por dosis unitarias, ya sean líquidas o sólidas, pueden con-
tener de 0,1 a 99 % de producto activo, siendo el intervalo
preferido alrededor de 10 a 60 %. Generalmente la composi-
30 ción contendrá alrededor de 100 a 2000 mg de ingrediente
activo, calculado sobre el peso total de la composición; sin
embargo, en general, es preferible emplear una dosis compren-

1 dida entre 250 y 2000 mg aproximadamente. En la administra-
ción parenteral, la dosis unitaria es habitualmente el com-
puesto puro en una solución acuosa estéril o en forma de
5 polvo soluble destinado a la disolución. Pueden prepararse
formulaciones representativas mediante los siguientes proce-
dimientos:

| <u>Cápsulas</u> | <u>Por cápsula</u> |
|---|--------------------|
| Antibiótico 890A ₂ | 400 mg |
| Lactosa, Farmacopea de 10 Estados Unidos, cantidad suficiente para llenar cápsulas del n° 0 apro- ximadamente de 475 mg cada una | |

15 En el ejemplo anterior, el compuesto activo y el di-
luyente se mezclan para producir una mezcla uniforme que
después se introduce en cápsulas de gelatina dura del n° 0,
a mano o en una máquina adecuada, según sea necesario. La
mezcla y el llenado se realizan preferiblemente en una zona
a una humedad relativa inferior al 40 %.

| <u>Tabletas</u> | <u>Por tableta</u> |
|---------------------------------------|--------------------|
| 20 Antibiótico 890A ₂ | 330,0 mg |
| Fosfato cálcico | 192,0 mg |
| Lactosa, Farmacopea de Estados Unidos | 190,0 mg |
| Almidón de maíz | 80,0 mg |
| Estearato magnésico | <u>8,0 mg</u> |
| 25 | 800,0 mg |

30 En el ejemplo anterior, el componente activo se mez-
cla con el fosfato cálcico, la lactosa y alrededor de la mi-
tad del almidón de maíz. La mezcla se granula con una pasta
de almidón de maíz al 15 %, se tamiza groseramente y después
se tamiza de nuevo a través de tamices del n° 16. Se añaden

1

el resto del almidón de maíz y del estearato magnésico y la mezcla se comprime en tabletas, de 0,5" (12,7 mm) aproximadamente de diámetro, con un peso de 800 mg cada una.

5

Alternativamente, el componente activo se mezcla con el fosfato cálcico, la lactosa y la mitad del almidón de maíz. La mezcla se transforma en gránulos en una prensa pesada para producir masas compactas similares a tabletas. Estas se deshacen hasta formar gránulos del n°.16. Se añade el resto del almidón de maíz y el estearato magnésico y la mezcla se comprime en tabletas de 0,5" (12,7 mm) aproximadamente de diámetro, con un peso de 800 mg cada una.

10

| <u>Forma lio (para inyección)</u> | <u>Por vial</u> |
|-----------------------------------|-----------------|
|-----------------------------------|-----------------|

| | |
|-------------------------------|--------|
| Antibiótico 890A ₂ | 500 mg |
|-------------------------------|--------|

15

| | |
|---|------|
| Agua para inyección, Farmacopea de Estados Unidos, c.s. hasta | 2 ml |
|---|------|

20

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

25

Para restablecer el producto para su administración parenteral, se agregan 2 ml de agua estéril para inyección al contenido de un vial.

| <u>Formas líquidas orales</u> | <u>Por 1000 ml</u> |
|-------------------------------|--------------------|
|-------------------------------|--------------------|

| | |
|-------------------------------|-------|
| Antibiótico 890A ₂ | 1,0 g |
|-------------------------------|-------|

| | |
|----------|---------|
| Sacarosa | 600,0 g |
|----------|---------|

30

| | |
|---------|---------|
| Glucosa | 250,0 g |
|---------|---------|

| | | |
|---|--|-----------|
| 1 | Benzoato sódico | 1,0 g |
| | Aceite de naranja concentrado | 0,2 ml |
| | Agua purificada, Farmacopea de Estados Unidos, hasta | 1000,0 ml |

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

10

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

REIVINDICACIONES

15 1. Un procedimiento para la producción del compuesto antibiótico MSD 890 A que comprende las siguientes etapas:

a) cultivar una cepa de Streptomyces flavogriseus en un medio nutritivo acuoso que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones aerobias sumergidas, a una temperatura comprendida entre 20 y 37°C aproximadamente y a un pH comprendido entre 6,0 y 8,0 aproximadamente;

20

b) recuperar el compuesto 890 A₂ y/o el 890 A₅ de dicho medio de cultivo.

25

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde el microorganismo cultivado es Streptomyces flavogriseus NRRL 8139 o NRRL 8140, y el compuesto obtenido es 890 A₂.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1,

30

1 donde el microorganismo es Streptomyces flavogriseus NRRL
8139 o NRRL 8140, y el compuesto obtenido es 890 A₅.

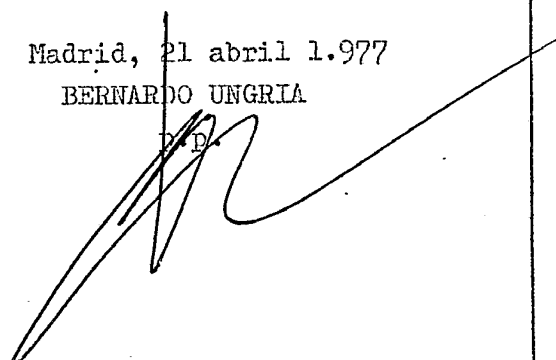
4. Un procedimiento según la reivindicación 1,
donde el microorganismo cultivado es Streptomyces flavo-
5 griseus NRRL 8139 o NRRL 8140, y los compuestos obtenidos
son 890 A₂ y 890 A₅.

5. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la patente de invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL COMPUESTO ANTIBIO-
10 TICO MSD 890A.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de setenta y cuatro
páginas mecanografiadas.

15 Madrid, 21 abril 1.977

BERNARDO UNGRIA



15

20

25

30

