

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

20 JUL 1978

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

19 ES

11

21

22

NUMERO
461.247
FECHA DE PRESENTACION
1.8.77

10 A1

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:	51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
-----------------	-----------	----------	---------

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

64 TITULO DE LA INVENCION  "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE SISOMICINA POR FERMENTACION".
--

71 SOLICITANTE (S)  ANTIBIOTICOS, S.A.
--

DOMICILIO DEL SOLICITANTE  Bravo Murillo, 38 - MADRID
---

72 INVENTOR (ES)  D. José Luis Fernández Puentes y D. Francisco Salto Maldonado
---

73 TITULAR (ES)  Antibióticos, S.A.
---

74 REPRESENTANTE  D. Germán González Porta
--

Con el nombre de antibióticos aminoglicósidos se conoce una amplia familia de antibióticos, que se caracterizan porque son carbohidratos y contienen varios grupos -aminos en sus estructuras glicosídicas. El primero de los antibióticos aminoglicósidos descubierto fue la estreptomina por Waksman en 1.944 y posteriormente la neomicina en 1.949, kanamicina en 1.957, paromomicina en 1.959, espectinomina en 1.962, gentamicina 1.963 y kasugamicina en 1.965. En los últimos años se han descrito muchos más, tales como -hibrimicinas, butirosinas, ribostamicina, lividomicina, nebramicina, etc..

La 0-2,6-diamino-2,3,4,6-tetradeso- $\alpha$ -D-glicerohex-4-enopiranoxil  $\rightarrow$  (1-4)-0-(3-desoxi-4-C-metil-3-(metilamino)- $\beta$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)-2-desoxi-D-estreptamina es un antibiótico aminoglicósido relacionado con las gentamicinas; y que se conoce también con los nombres de antibiótico 6640, rickamicina y sisomicina.

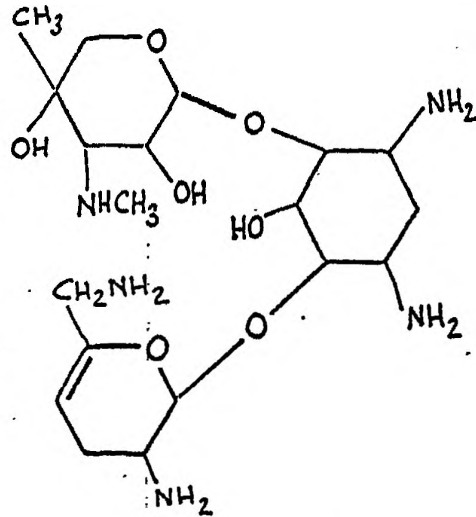
Este antibiótico lo producen los siguientes microorganismos conocidos: Micromonospora inyoensis (Weinstein et al. J. Antibiotics 23:551:554, 1.970), Micromonospora grisea - (Patente francesa 2.159.246) y Micromonospora zionensis (J.A. Márquez et al. J. Antibiotics 29:483:487, 1.976), siendo el primero el único que lo produce como componente principal en el medio de cultivo, pues los otros dos microorganismos lo coproducen con 6'-C-metilsisomicina (Micromonospora grisea) - y con 6'-N-metilsisomicina (Micromonospora zionensis).

La sisomicina, es un antibiótico activo frente a microorganismos grampositivos y gramnegativos, que por su baja toxicidad, comparado con otros aminoglicósidos (LODE, H. et al. Dtsch. Med. Wochsr., 100:2144, 1.976), tiene gran interés en

medicina humana.

La composición química de la sisomicina corresponde a la estructura que se expone en la figura 1 (Reiman, H. et al. J. Org. Chem. 39:14511457, 1.975).

5.-



10.-

15.-

Fig. 1.

### RESUMEN

En este invento se describe un nuevo proceso de producción de sisomicina por medio de una nueva Micromonospora, Micromonospora sp. cepa 41/12 (A.S.A.), que a diferencia con las anteriormente mencionadas crece en manitol y puede utilizarlo para la producción del antibiótico, aún cuando también lo produzca con otras fuentes de carbono.

20.-

### Descripción detallada del invento

En este invento se describe un nuevo proceso para la producción por fermentación de sisomicina. En este proceso se utiliza un nuevo microorganismo distinto de los patentados previamente; Micromonospora sp. cepa 41/12 (A.S.A.).

25.-

30.-

Para caracterizar a esta cepa se hicieron cultivos en los medios de estudio de crecimiento e identificación que se exponen en el siguiente cuadro:

CUADRO I

Nº	Denominación	Referencia
	1 Agar agua del grifo (LEON)	-----
5.-	2 Agar almidón*	Waksman S.A. The Actinomyce- tes Vol. 2 pág. 330 (1.961)
	3 Agar Bennett*	Waksman S.A. ibid. pág. 331
	4 Agar de Czapek (sacarosa)*	Waksman S.A. ibid. pág. 328
	5 Agar de Emerson*	Waksman S.A. ibid. pág. 331
	6 Agar gelatina	Waksman S.A. ibid. pág. 330
10.-	7 Agar glucosa-asparagina	Waksman S.A. ibid. pág. 328
	8 Agar glucosa-extracto de levadura	Waksman S.A. ibid. pág. 331
	9 Agar glucosa-tirosina	Waksman S.A. ibid. pág. 329
	10 Agar peptona-hierro	Waksman S.A. ibid. pág. 332
15.-	11 Agar tirosina	Gordon R.E. y Smith M.M. J. Bacteriol. 69:147-150 (1.955)
	12 Agar nº 172 de la ATCC	Catálogo de la ATCC 11ª edi- ción, pág. 278 (1.974)
	13 Medio para la reducción de nitratos	Waksman S.A. ibid. pág. 332
	14 Medio para la reducción de nitratos con glucosa	-----
20.-	15 Leche descremada	-----
	16 Leche descremada (Hidrólisis)	Luedemann G.M. Inter. J. Syst. Bacteriol. 21(3):240-247(1971)
	17 Patata	Luedemann G.M. ibid.
	18 Patata con CO <sub>3</sub> Ca	Luedemann G.M. ibid.
25.-	19 Resistencia al ClNa	Luedemann G.M. ibid.
	20 Utilización de carbohidrato	Luedemann G.M. ibid.
	21 Utilización de fuentes de nitrógeno	Luedemann G.M. ibid.

\* Medios con 0,1% de CO<sub>3</sub>Ca

El estudio de caracterización se hizo comparativamente con *Micromonospora inyoensis* cepa ATCC 27600, por ser ésta la que produce como compuesto principal el mismo compuesto antibiótico que la *Micromonospora* sp. 41/12 - (A.S.A.).

5.-

Con los dos microorganismos se sembraron los medios citados, siempre por duplicado, leyéndose a los 7 y 14 días. La temperatura de incubación fué de 28° C. El estudio de los colores se hizo según las planchas de color del "Code Universal de Couleurs" de M. Séguy, editado por P. Lechevalier: París 1.936, y cuando no se encontraba en dichas planchas, se les denominaba subjetivamente. Los resultados de las propiedades morfológicas se exponen en el cuadro II y el de los estudios de asimilación de fuentes de Carbono y Nitrogeno en los cuadros III y IV respectivamente.

10.-

15.-

El micelio que produce en los medios sólidos es el denominado de sustrato. No se pudo observar esporulación en ninguno de los tipos de medios de cultivo empleados.

20.-

Otras propiedades de la cepa 41/12 son: reduce nitratos a nitritos, produce invertasa, provoca cambios en la leche descremada a los 21 días, así mismo la hidroliza, hidroliza el almidón, es sensible al ClNa, pues con 2,5% ya empieza a crecer mal, no se observa la existencia

25.-

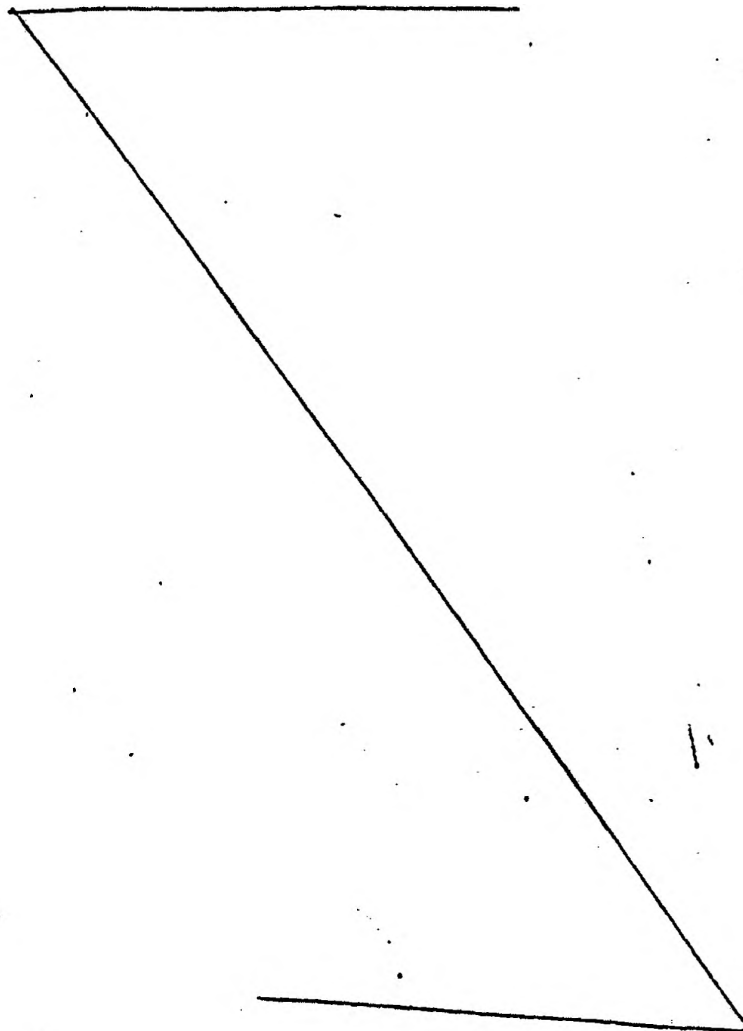
de tirosinasa. Entre los 25 y 37° C crece bien, tanto en medio sólido, como líquido. Cuando crece bien en los medios sólidos y líquidos esta cepa produce un pigmento que va de color vino tinto a color castaño rojizo. El micelio tiene un pigmento parecido al de *Micromonospora purpurea*, pues tiene un color rojizo a pH ácido y azul-verdoso a pH básico.

30.-

Si comparamos esta cepa con las productoras de sisomicina, podemos observar las siguientes diferencias:

5.- a) La cepa 41/12 crece bien en manitol, cosa que no hace ninguna otra cepa de *Micromonospora* conocida productora de antibióticos aminociclitoles, incluidas las productoras de sisomicina.

10.- b) La cepa 41/12 no crece en xilosa, cosa que ocurre en todas las cepas conocidas productoras de sisomicina (*Micromonospora inyoensis* ATCC 27600, *Micromonospora grisea* NRRL 3800 y *Micromonospora zionensis* NRRL 5466).



CUADRO II.- Estudio morfológico microscópico.

	Micromonospora sp. cepa 41/12				Micromonospora inyoensis ATCC 27600			
	Intensidad crecimiento	Color An- verso	Color Re- verso	Morfología crecimiento	Intensidad crecimiento	Color An verso	Color Re verso	Morfología crecimiento
1	±	Incoloro	Incoloro	No se obser- van esporas.	±	Incoloro	Incoloro	Muchas es- poras
2	+	71	71 oscuro	plano	+	306	306	plano
3	+++	343	341	rugoso	+++	641	641	abombadas pig. liger
4	+	37	37	plano	++	81	696 apr.	globoso liso
5	++	127	127	festoneado plano con protuberan- cias alargada- das.	-			
6	+	199	199	plano	+	193 claro	193 cl.	plano
7	±	incoloro	incoloro		±	incoloro	incoloro	
8	++	de 146 a crema	de 146 a crema	rugoso fes- toneado cen- tro más os- curo	+++	203 borde 162 oscu- en centro	203-162	muy rugo- so
9	±	incoloro	incoloro		±	incoloro	incoloro	
10	+	incoloro	incoloro	plano	-			
11	+	248		no disuelve cristales	++	191	186	disuelve cristales
12	+++	104	56	muy rugoso pig. ligero	+++	116	116	muy rugo- so
13	±			reducción dudosa	-			
14	-				-			
15	±	no varía		no varía	+	no varía		coagula fuertemen- te a los 14 días
16	++	hidrólisis fuerte			+	hidrólisis fuerte		
17	-				-			
18	+++	126		rugoso pig. 126	+++	196		rugoso

CUADRO III.- ASIMILACION DE FUENTES DE CARBONO

Fuente de C	Micromonospora sp. cepa 41/12	M. inyoensis ATCC 27600	M. grisea NRRL 3800	M. Zionensis NRRL 5466
Control (sin azúcar)	—	—	—	—
D-arabinosa	—	—	++	+
L-arabinosa	++	—	++	++
Sacarosa	++	++	++	++
α-melibiosa	—	—	—	—
D-manitol	++	—	—	—
Rafinosa	—	—	—	—
Glicerol	—	—	—	—
L-ramnosa	—	—	—	—
I-inositol	—	—	—	—
D-glucosa	++	++	++	++
D-xilosa	—	+	++	++
D-galactosa	±	±	+	—
D-levulosa (fructosa)	++	—	+	—
β-lactosa	—	—	—	—
Almidón soluble	++	++	++	++
D-ribosa	+	+	++	—

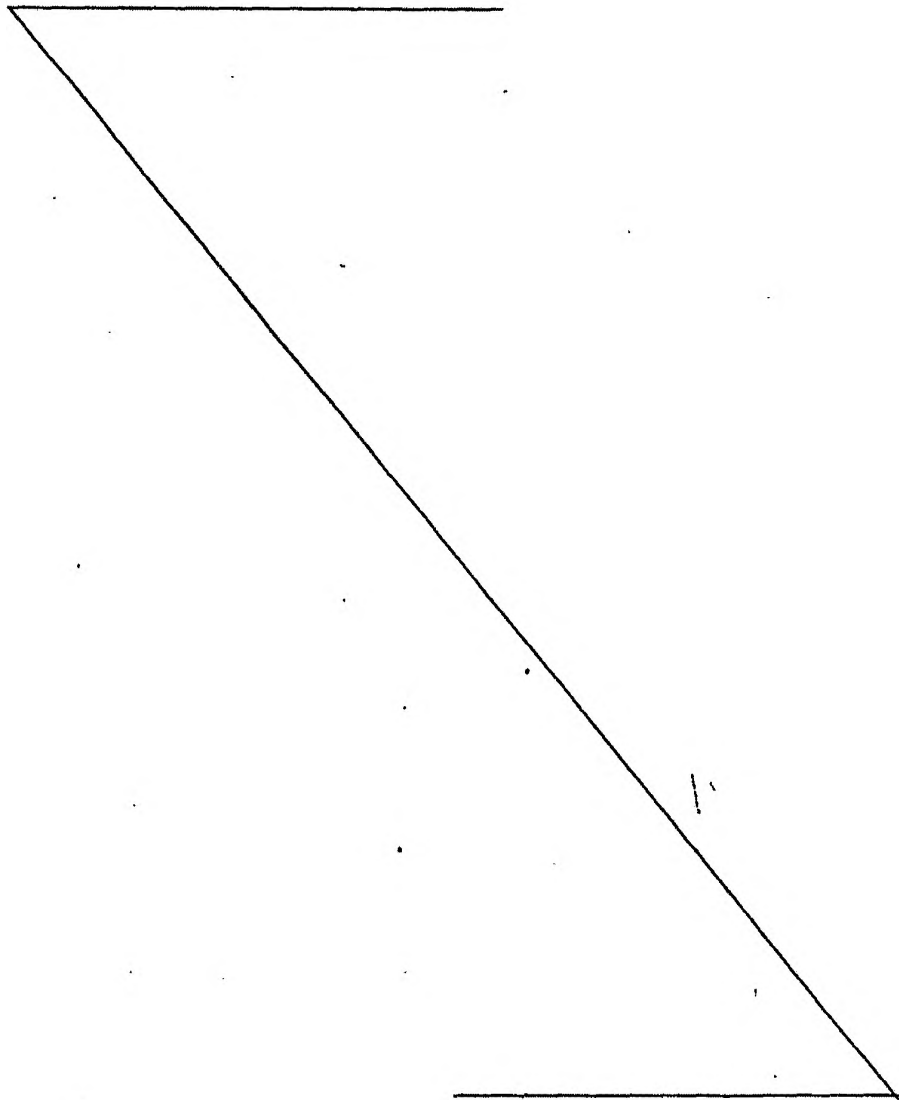
El valor de los signos es el indicado en la ref. SHIRLING, EB. et al.

Int. J. Syst. Bacteriol: 16, 313-340 (1.966)

CUADRO IV.-

Asimilación de fuentes de nitrógeno

<u>Fuente de N</u>	<u>Micromonospora sp. cepa 41/12</u>	<u>Micromonospora in- yoensis ATCC 27600</u>
N-Z amina	++	++
Levadura	-	-
Asparragina	±	±
Glutamato	-	-
Nitrato amónico	-	-
Control	-	-



c) La de Micromonospora 41/42 (A.S.A.) crece en L-arabinosa y fructosa, mientras que la cepa ATCC 27600 de Micromonospora inyoensis, no.

5.- d) La cepa de Micromonospora inyoensis estudiada por nosotros esporula en los medios de agar incluyendo el agar-agua de grifo, cosa que no ocurre con la Micromonospora 41/42 (A.S.A.).

10.- e) Micromonospora inyoensis ATCC 27600 disuelve los cristales de tirosina, y nuestra Micromonospora 41/42 (A.S.A.) no los disuelve indicando que presenta un comportamiento bioquímico diferente de aquélla.

f) Nuestra Micromonospora 41/42 (A.S.A.) crece - bien en medio de Emerson y Micromonospora inyoensis ATCC - 27600 no.

15.- g) La coloración de las colonias de ambas cepas en los medios de agar en que crecen ambas (Bennett, glucosa-extracto de levadura, almidón 172, etc.) es muy distinto, yendo en la cepa 41/42 (A.S.A.) desde 343 (pardo oscuro) - en agar de Bennett pasando por 146 (rojo-ocre) en agar-glucosa-extracto de levadura, hasta 104 en el medio 172 de la ATCC, que es un color castaño-rojizo-violeta, y en la cepa ATCC 27600 de Micromonospora inyoensis desde 701 (tierra-sombra), 203 (Isabella), 116 (pardo negruzco) respectivamente.

25.- Todas estas diferencias demuestran, fuera de toda duda, que nuestro microorganismo es muy distinto de Micromonospora inyoensis ATCC 27600. MEHTA et al. (Appl. Envir. Microbiol. 33, 1013-1015. 1977) han demostrado, con dos microorganismos que crecen en manitol, que el hecho de crecer en manitol implica la existencia de unos sistemas enzimáticos

30.-

distintos, lo que permite agrupar a nuestros microorganismos en un grupo específico distinto del de las micromonosporas que no crecen en manitol.

5.- Por tanto, al no ser ni mutante ni subespecie de ella, y haber demostrado que produce sisomicina en presencia de manitol, consideramos objeto de patente el procedimiento de obtención de sisomicina con este nuevo microorganismo en presencia de manitol como fuente de carbono.

10.- Para cultivar actinomicetos en medios líquidos para la producción de antibióticos aminociclitolos aminoglicósidos, es habitual el uso de harina de soja como fuente principal de proteínas, como ocurre en la fermentación de estreptomicina (patente U.S.A. 2.533.942), neomicina - (patente alemana 1.011.119), kanamicina (patente alemana 1.054.668), complejo de gentamicina (patente U.S.A. 3.091.572), 15.- sisomicina y derivados (patente francesa 2.159.246), etc.. También es frecuente el uso de sales minerales:  $\text{ClNa}$ ,  $\text{SO}_4\text{Mg}$ ,  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ,  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , etc.. y de oligoelementos. Como fuente de carbono es habitual el uso de glucosa y almidón entre otras 20.- fuentes de carbono asimilables.

El cultivo de la cepa 41/12 de *Micromonospora* sp., para la producción del antibiótico no es una excepción a lo dicho anteriormente, pues la composición en los medios en los cuales puede producirlo, puede ser muy variable siempre 25.- que se empleen a la vez fuentes de carbono y nitrógeno apropiadas, que además de ser asimiladas pueden ser utilizadas para la producción del antibiótico: glucosa, sacarosa, almidón, levadura, harina de soja, harina de girasol, etc.. Lo que sí es excepcional de esta cepa, es su capacidad de 30.- producir el antibiótico en presencia de manitol. Los nutrien-

- tes citados se pueden utilizar en forma de una fuente de carbono y una única fuente de nitrógeno o varias a la vez. También como ocurre en las fermentaciones conocidas de -
- 5.- actinomicetos productores de antibióticos, se deben añadir al medio sales minerales (cloruro sódico, sulfato amónico, etc..) y una solución de oligoelementos tales como: hierro, cobalto, magnesio, zinc y manganeso. También se pueden -
- 10.- añadir para facilitar la buena marcha de la fermentación - agentes antiespumantes, tales como aceites vegetales o grasas animales o siliconas. Como agente regulador del pH - del medio de cultivo se puede emplear  $\text{CO}_3\text{Ca}$ . La aireación y la agitación en el recipiente fermentador debe de ser la habitual en el cultivo de actinomicetos productores de antibióticos. La temperatura óptima está entre 26 y 35° C.
- 15.- Para comenzar una fermentación puede utilizarse para la siembra del medio de cultivo bien una suspensión - (estéril) de esporas de la Micromonospora 41/12 (A.S.A.) obtenida a partir de este microorganismo desecado mediante la liofilización o bien una suspensión estéril de dicho -
- 20.- microorganismo preparada a partir de un cultivo previo en : medio sólido, contenido en un tubo, denominado "tubo inclinado o slant". La suspensión estéril obtenida se siembra estérilmente en matraces de Erlenmeyer con un medio de cultivo adecuado para el crecimiento del microorganismo. El -
- 25.- crecimiento óptimo se alcanzará entre los 2 y 4 días, pasados los cuales, se puede ya sembrar el fermentador (u otras etapas de inóculo, dependiendo del volumen de medio de fermentación que se quiere sembrar). El tiempo de crecimiento puede acortarse o alejarse según las condiciones físicas que
- 30.- se empleen (temperatura, agitación, aireación, etc..).

La fermentación propiamente dicha, se hará en los medios apropiados para la producción del antibiótico, los cuales serán sembrados con los inóculos mencionados anteriormente.

5.-

La duración de esta fermentación también dependerá de las condiciones físico-químicas de la misma. El momento de la cosecha se establece al alcanzar en el medio de cultivo la máxima concentración en el antibiótico deseado lo cual se determina mediante la valoración de su actividad o potencia antibiótica medida por su acción sobre

10.-

un microorganismo sensible, que en este caso es el *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, que se utilizará según las técnicas habituales de valoración por placas. El caldo de fermentación utilizado para esta valoración debe acidificarse hasta un pH = 2 y mantenerlo durante 30 minutos en agitación a dicho pH; después se centrifuga y el sobrenadante se alcaliniza hasta un pH comprendido entre 7,5 - 8,5.

15.-

20.-

El pH al final de la fermentación está entre 7 y 8. Todos los medios y operaciones deberán de hacerse en condiciones de esterilidad para evitar la aparición de microorganismos contaminantes.

Únicamente para ilustrar mejor este invento se exponen los siguientes ejemplos:

25.-

EJEMPLO 1

Se prepara un medio con la composición siguiente:

30.-

Manitol	30 g
Extracto de levadura	5 g
Triptona	5 g
CO <sub>3</sub> Ca	4 g
Agua c.s.p.	1.000 ml

Este medio se reparte en recipientes normales para las fases de inoculación en la fermentación del antibiótico, a razón de 10 - 60 partes de volumen de medio por 100 partes en volumen del recipiente, se esteriliza el medio a vapor, se deja enfriar a unos 25 - 30° C y se siembra con la suspensión estéril del microorganismo.

Se incuba con agitación y aireación durante tres días a 30° C. Con este inóculo u otro cualquiera en el que crezca bien el microorganismo, se puede ya sembrar el medio de fermentación, aunque se pueden necesitar más pases por el mismo medio (hasta 5 ó 6) según el volumen del fermentador que se desee sembrar. En este caso se harán los pases sembrando con 5-10% del inóculo anterior. La incubación de cada pase variará de 1-3 días según el número de pases que sea.

El medio de fermentación tiene la composición siguiente:

	Manitol	30 g
20.-	Levadura de panificación	15 g
	CO <sub>3</sub> Ca	4 g
	Cl <sub>2</sub> Co . 6 H <sub>2</sub> O	0'01 g
	SO <sub>4</sub> Mn . 4 H <sub>2</sub> O	0'03 g
	SO <sub>4</sub> Zn . 7 H <sub>2</sub> O	0'05 g
25.-	SO <sub>4</sub> Fe . 7 H <sub>2</sub> O	0'03 g
	Agua c.s.p.	1.000

Este medio se distribuye en recipientes normales para la fermentación de antibióticos a razón del 40 - 60 % de su capacidad total. Se esteriliza con vapor a 121° C durante 20 minutos. Se enfría y se siembra con el 5 - 10 %

de su volumen del inóculo ya crecido y se incuba a 30° C. Los fermentadores estarán provistos de los mecanismos habituales de agitación, aireación, control de pH y temperatura (si en la fermentación se produce espuma en cantidades que se considera excesivas se añade un agente antiespuma, bien aceite o una silicona apropiada). Después de un tiempo de fermentación de unas 120 horas se cosecha el caldo -

5.-

para su extracción. El caldo en ese momento presenta un color (710 del Código de colores de Seguy) castaño violáceo claro y cuando se centrifuga el color del sobrenadante es cuero rojizo claro (202), tostado claro y el del sedimento (micelio), violeta grisáceo muy claro (180). La producción es de 50 - 100 u/ml, en un tiempo de fermentación de 120 a 168 horas.

10.-

15.-

Si en el medio descrito en este ejemplo no se le añade manitol, la producción está alrededor de las 5 u/ml.

#### EJEMPLO 2

Se prepara un inóculo como se ha indicado en el ejemplo 1. Una vez cultivado en la misma forma se utiliza para sembrar, un medio con la siguiente composición:

20.-

Manitol	30 g
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	4 g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>	2 g
SO <sub>4</sub> Mg . 7 H <sub>2</sub> O	4 g
CO <sub>3</sub> Ca	5 g
SO <sub>4</sub> Fe . 7 H <sub>2</sub> O	0'015 g
SO <sub>4</sub> Cu . 5 H <sub>2</sub> O	0'0015 g
SO <sub>4</sub> Zn . 7 H <sub>2</sub> O	0'0015 g
Cl <sub>2</sub> Co . 6 H <sub>2</sub> O	0'0004 g
SO <sub>4</sub> Mn. H <sub>2</sub> O	0'00015 g

25.-

30.-

Agua destilada c.s.p. 1.000 ml

El sistema de cultivo es el descrito en el ejemplo 1.

La producción es de 70 - 150 u/ml. Si no se le añade manitol la producción es de 10 - 15 u/ml.

5.-

EJEMPLO 3

Se prepara un inóculo con la siguiente composición:

Glucosa	10
Almidón soluble	20
Extracto de levadura	5
Triptona	5
CO <sub>3</sub> Ca	4
Agua c.s.p.	1.000 ml

10.-

Este inóculo se siembra y se cultiva como ya se ha indicado en el ejemplo 1. Se utiliza para sembrar al 5 - 10% un medio de fermentación estéril de la siguiente composición:

15.-

Glucosa	10
Almidón	20
Levadura	20
ClNa	4
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2
CO <sub>3</sub> Ca	4
Ion Cobaltoso (Co <sup>++</sup> )	1 p.p.m.
Agua destilada c.s.p.	1.000

20.-

25.-

El cultivo se efectuará como ya se ha indicado, alcanzándose más de 50 u/ml al final de la fermentación.

Es un hecho conocido que, esencialmente, los antibióticos aminoglicósidos se extraen del caldo de fermentación, sometiendo éste a la siguiente serie de procesos:

30.-

1) Lisis del micelio para dejar en libertad al antibiótico.

- Esta lisis puede hacerse mediante la adición de disolventes orgánicos tal como cloroformo al 2% durante 2 horas a temperatura ambiente. También se puede lograr la lisis del micelio mediante la acidificación del caldo a pH próximos a 2. Aunque se puede emplear cualquier ácido, el más generalmente utilizado es el ácido sulfúrico.
- 5.- 2) Filtración o centrifugación del caldo lisado para obtener una disolución del aminoglicósido exenta de sólidos insolubles que precipitan con cualquiera de ambos tratamientos descritos.
- 10.- 3) Neutralización y adsorción sobre una resina intercambiadora de cationes. Las más generalmente empleadas son las de tipo carboxílico tales como Amberlita R IRC-50 o similares. En algunos casos, tales como en la estreptomicina es más frecuente usar la resina en forma sódica, mientras que en otros como en la neomicina es frecuente el empleo de resinas en forma amónica.
- 15.- 4) Elución del antibiótico de la resina. Suele hacerse con ácidos, cuando se ha empleado la resina en forma sódica y con amoniaco cuando para adsorber el antibiótico se ha empleado una resina en forma amónica.
- 20.- 5) Purificación del eluato, que puede hacerse sometiéndole a una nueva adsorción más selectiva o mediante el tratamiento con reactivos precipitantes tales como antraquinon- $\beta$ -sulfonato, tergitato, pentaclorofenol, etc..
- 25.- 6) Eliminación de sales y concentración. La eliminación de sales suele hacerse mediante el empleo de disolventes orgánicos o con el uso combinado de resinas intercambiadoras de aniones y cationes.
- 30.- 7) Precipitación o cristalización del antibiótico a partir

del concentrado. Generalmente se aprovecha, como en la estreptomycin, la insolubilidad de los sulfatos en metanol.

5.- Para la extracción del caldo de fermentación de la cepa 41/12, obtenido como se ha indicado, hemos seguido esencialmente el método general citado para la extracción de aminoglicósidos adaptándolo a nuestras necesidades.

La cromatografía en papel es un método adecuado para la identificación del antibiótico 41/12 en los caldos de fermentación.

10.- Según Wagman and Weinstein. Chromatography of - Antibiotics. Elsevier Scientific Publishing Company 1.973 pág. 171, empleando papel Whatman nº 1 la sisomicina posee las siguientes Rf. en los sistemas que se indican:

<u>Sistema</u>	<u>Rf</u>
15.- Metanol 80 % + ClNa 3 % p/v (1:1) Papel tamponado con sulfato sódico 0,95 M + bisulfato sódico 0,05 M.....	0,49
Propanol: piridina : ácido acético : agua (6:4:1:3) .....	0,29
20.- Benceno : metanol (9:1) .....	0,00
Butanol saturado de agua + Acido p-toluenosulfónico 2 % .....	0,51
Cloroformo : metanol : 17% hidróxido amóni co (2:1:1) .....	0, 21

25.- Nuestro caldo de fermentación presenta un componente principal cuyo Rf. coincide con los indicados anteriormente para la sisomicina, y otro componente en menor concentración que prácticamente permanece en el punto de aplicación cuando se emplea el último de los sistemas citados.

30.- El caldo, lisado y neutralizado se puede adsorber

5.- sobre IRC-50 ( $\text{NH}_4^+$ ) y eluir con hidróxido amónico. Al llevar a sequedad el eluato, se obtiene un producto impuro, - el cual se purifica mediante cromatografía sobre silicagel usando como disolvente la fase inferior de una mezcla de - cloroformo-etanol-hidróxido amónico concentrado (1:1:1). Posteriormente el producto obtenido se pasó por resina - DOWEX 1 x 2 ( $\text{OH}^-$ ) liofilizándose las fracciones correspondientes.

10.- El producto así obtenido presenta unas características físicas, espectros IR y NMR, coincidentes con las de la sisomicina.

#### EJEMPLO 4

15.- El caldo de fermentación se ajusta a pH entre 3-4 con ácido oxálico sólido y seguidamente se pone a pH 2 mediante la adición de ácido sulfúrico 5 N.

Seguidamente se centrifuga, obteniéndose un líquido libre de sólidos, el cual se neutraliza con KOH 4 N hasta pH 7,5. A continuación el caldo neutralizado se filtra para obtener un líquido exento de sólidos.

20.- 1,5 l de caldo filtrado se pasan a través de una columna que contiene 10 c.c. de resina IRC-50 ( $\text{Na}^+$ ).

25.- Una vez pasado el caldo, por la resina se lava esta con 100 c.c. de agua, y seguidamente se resuspende la resina en 100 cc de agua, ajustándose el pH de la resuspensión a pH = 5,2 - 5,4 con disolución saturada de ácido oxálico. Mantener el mencionado pH durante media hora. Transcurrido este tiempo se filtra y se lava la resina con 50 c.c. de agua.

30.- Seguidamente se resuspende la resina en 100 c.c. de agua y se hace la elución con ácido sulfúrico 2 N hasta

- 5.- pH = 1,8 - 2 constante durante 15 minutos. A continuación se filtra y lava con 10 c.c. de agua. El eluato así obtenido se pasa a través de una columna que contiene 10 c.c. de resina DEACIDITE ( $\text{OH}^-$ ). Una vez pasado el eluato, se lava la resina con 50 c.c. de agua. Finalmente se mezclan los eluatos y se concentran hasta 5 c.c. donde se identifica la presencia de sisomicina mediante cromatografías en papel y de capa fina. El eluato concentrado se añade sobre 100 c.c. de metanol, obteniéndose un sulfato de sisomicina de aproximadamente 620 u/mg valorado microbiológicamente frente a *staph. aureus* ATCC 6538 P.
- 10.-

#### EJEMPLO 5

- 15.- El caldo una vez lisado, tal como se ha descrito anteriormente se neutraliza a pH 7,5 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado, filtrándose a continuación. El caldo exento de sólidos se pasa a través de una columna conteniendo resina IRC 50 ( $\text{NH}_4^+$ ). Una vez pasado el caldo, se lava la resina con agua y seguidamente se eluye con amoníaco 2 N hasta conseguir que el pH de salida sea igual al de entrada, o sea, en este caso 7,5. El eluato así obtenido se concentra a sequedad obteniéndose un producto sólido muy coloreado.
- 20.-

- 25.- 5 g de este producto sólido se disuelven en 15 c.c. de agua pasándose a través de una columna 2,5 : 35 cm de DOWEX 1 x 2 ( $\text{OH}^-$ ) recogiendo bajo atmósfera de nitrógeno, fracciones de 15 c.c. Cada fracción se controla mediante cromatografía en capa fina, juntándose las fracciones que contienen sisomicina. La mezcla de fracciones (7-13) se acidifica con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  5 N hasta pH 4,5. Seguidamente se concentran hasta 2 c.c. precipitándose mediante la adición sobre 100 c.c. de metanol. El producto obtenido, una vez
- 30.-

5.- seco, pesó 7,5 g que se identifican por sus características físico-químicas como sulfato de sisomicina con una potencia aproximada de 620 mcg/mg. Por cromatografía en papel y revelado biológico se detecta una mancha principal correspondiente a la sisomicina y otra de Rf. menor, menos intensa y hasta ahora no identificada.

REIVINDICACIONES

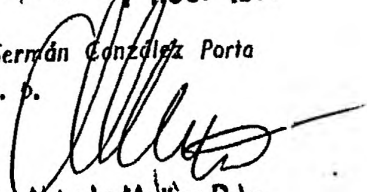
10.- 1ª.- "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE SISOMICINA POR FERMENTACION" caracterizado por el hecho de que la aludida fermentación se realiza en un medio líquido para la propagación por cultivo aerobio del microorganismo Micromonospora s.p. cepa A.S.A. - 41/12, teniendo este medio como principal fuente de carbono, un polialcohol, tal como el D (+) manitol y no un carbohidrato.

15.- 2ª.- "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE SISOMICINA POR FERMENTACION".

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, que consta de VEINTI UNA HOJA, escrita por una sola de sus caras.

Madrid, 1 AGO. 1977

Germán González Porta  
p. p.

  
Fdo: Alejandro Martínez Delso