

NUMERO	(10) A1
463.973	
FECHA DE PRESENTACION	
8-NOVIEMBRE-1977	



ESPAÑA

20 OCT. 1978

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
742.958	17-11-1976	Estados Unidos.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07G	

(54) TITULO DE LA INVENCION
" UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL ANTIBIOTICO 890A ₁₀ "

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

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

(72) INVENTOR (ES)
Patrick J. Cassidy; Sheldon B. Zimmerman; Josefino B. Tunac y Sebastián Hernández.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

CM.-

RESUMEN DE LA INVENCION

1
5
El antibiótico MSD 890A₁₀ y sus sales farmacéuticamen-
te aceptables (denominado en lo que sigue antibiótico 890A₁₀)
es activo contra las bacterias Gram-positivas y Gram-nega-
tivas. El antibiótico se obtiene cultivando especies de
Streptomyces en medios de fermentación adecuados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10
15
El descubrimiento de las notables propiedades antibió-
ticas de la penicilina estimuló un gran interés en este
campo que ha dado lugar al hallazgo de otras muchas sustan-
cias antibióticas valiosas. En general, la actividad anti-
bacteriana de cada uno de estos antibióticos no incluye a
ciertas bacterias patógenas clínicamente importantes. Por
ejemplo, algunos son activos principalmente solo contra los
tipos Gram-positivos de bacterias. La resistencia adquiri-
da a causa del extenso uso de los antibióticos existentes
en el tratamiento de las infecciones bacterianas ha dado lu-
gar a la aparición de un gran problema de resistencia.

20
Por consiguiente, las deficiencias de los antibióticos
conocidos han estimulado nuevas investigaciones para hallar
otros antibióticos que fueran activos contra una gama más
amplia de patógenos así como contra las cepas resistentes
de microorganismos particulares.

COMPENDIO DE LA INVENCION

25
Esta invención se refiere a un nuevo agente antibió-
tico. Trata de una nueva sustancia antibiótica, denominada
aquí 890A₁₀. La invención comprende el antibiótico en forma
diluída, como concentrado crudo y en forma pura.

30
Un objeto de esta invención es proporcionar un nuevo
y útil antibiótico que es altamente eficaz en la inhibición

1 del crecimiento de diversos microorganismos Gram-negativos
y Gram-positivos. Otro objeto es proporcionar un procedimien
to para la preparación de la nueva sustancia antibiótica
por fermentación de medios nutritivos con especies de Strep-
5 tomyces. Otros objetos resultarán evidentes en la descrip-
ción detallada de esta invención dada en lo que sigue.

La nueva sustancia antibiótica de esta invención es pro-
ducida cultivando en condiciones controladas una nueva cepa
de Streptomyces flavogriseus.

10 Basándose en extensos estudios taxonómicos, la cepa de
microorganismo utilizada en esta invención fué identificada
como perteneciente a la especie Streptomyces flavogriseus
y ha sido designada con la clave MA-4638 en la colección
de cultivos de Merck & Co., Inc., Rahway, N.J. Un cultivo
15 de la misma se ha colocado en depósito permanente sin res-
tricciones en cuando a su disponibilidad en la colección de
cultivos de los Northern Regional Laboratories, Northern
Utilization Research and Development Division, Agricultural
Research Service, Departamento de Agricultura de Estados
20 Unidos, Peoria, Ill., y está a disposición del público bajo
el número de accesión NRRL 11.020.

El Streptomyces flavogriseus MA-4638 produce el antibió-
tico 890A₁₀ que es aislado en forma sustancialmente pura del
caldo de fermentación.

25 Las características morfológicas y de cultivo del
Streptomyces flavogriseus MA-4638 están indicadas en la si-
guiente tabla.

Morfología - los esporóforos son ramificados, con cadenas
30 lisas a flexuosas de esporas, formando mechones. Las ca-
denas tienen una longitud de más de 10 esporas. Las espo-

1 ras son de forma esférica a oval - $0,9\mu \times 1,2\mu$ (970x).

Características de cultivo

Agar harina de avena (ISP Medio 3)

5 Crecimiento vegetativo - reverso tostado amarillento bordeado de marrón, arrugado;

Micelio aéreo - gris pálido bordeado de gris medio;

Pigmento soluble - ninguno.

Agar Czapek Dox (agar sacarosa-nitrato)

10 Crecimiento vegetativo - reverso marrón bordeado de marrón oscuro;

Micelio aéreo - gris medio, aterciopelado;

Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio.

Agar albúmina de huevo

15 Crecimiento vegetativo - reverso tostado amarillento bordeado de marrón;

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

Pigmento soluble - tostado amarillento pálido.

Agar glicerol-asparagina

20 Crecimiento vegetativo - reverso marrón;

Micelio aéreo - aterciopelado, gris pálido con tono amarillento (2dc);

Pigmento soluble - tostado pálido.

Agar sales inorgánicas -almidón (ISP Medio 4)

25 Crecimiento vegetativo - reverso tostado verdoso amarillento;

Micelio aéreo - aterciopelado, gris medio con tono amarillo (3fe);

Pigmento soluble - tostado muy pálido

30 Agar extracto de levadura-dextrosa + sales

- 1 Crecimiento vegetativo - reverso marrón oscuro;
 Micelio aéreo - gris oscuro mezclado con un gris más
 claro;
 Pigmento soluble - ninguno.
- 5 Agar extracto de levadura-extracto de malta (ISP Medio 2)
 Crecimiento vegetativo - reverso marrón;
 Micelio aéreo - aterciopelado, gris oscuro bordeado con
 un gris más claro;
 Pigmento soluble - ninguno.
- 10 Agar leche descremada
 Crecimiento vegetativo - tostado;
 Micelio aéreo - esparcido, blanquecino;
 Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio;
 Hidrólisis de la caseína - buena
- 15 Leche de tornasol
 Crecimiento vegetativo - anillo de crecimiento moderado,
 tostado;
 Micelio aéreo - ninguno
 Color - púrpura;
- 20 Coagulación y/o peptonización - peptonización completa,
 volviéndose alcalina
- Leche descremada
 Crecimiento vegetativo - anillo de crecimiento moderado,
 tostado;
- 25 Micelio aéreo - ninguno;
 Pigmento soluble - marrón pálido;
 Coagulación y/o peptonización - peptonización completa,
 volviéndose alcalina
- 30 Agar tirosina nutriente
 Crecimiento vegetativo - reverso marrón oscuro;

- 1 Micelio aéreo - gris oscuro bordeado de blanco grisáceo;
Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio;
Descomposición de la tirosina - positiva.
- 5 Agar peptona-hierro-extracto de levadura
Crecimiento vegetativo - tostado;
Micelio aéreo - blanquecino, moderado;
Pigmento soluble - ninguno;
Melanina - nada;
Producción de H₂S - negativa.
- 10 Agar nutriente
Crecimiento vegetativo - reverso marrón grisáceo pálido;
Micelio aéreo - gris pálido bordeado de gris oscuro;
Pigmento soluble - ninguno.
- 15 Agar almidón nutriente
Crecimiento vegetativo - tostado bordeado de gris;
Micelio aéreo - gris medio;
Pigmento soluble - ninguno;
Hidrólisis del almidón - buena.
- 20 Agar gelatina nutriente
Crecimiento vegetativo - tostado bordeado de gris;
Micelio aéreo - blanco grisáceo;
Pigmento soluble - ninguno;
Licuefacción de la gelatina - buena.
- 25 Trozo de patata
Crecimiento vegetativo - tostado;
Micelio aéreo - gris medio a oscuro;
Pigmento soluble - ninguno.
- 30 Suero sanguíneo de Loeffler
Crecimiento vegetativo - color crema;
Micelio aéreo - ninguno;

1 Pigmento soluble - ninguno;

Licuefacción - ninguna.

Planchas de gelatina

Crecimiento vegetativo - tostado;

5 Micelio aéreo - ninguno;

Pigmento soluble - ninguno;

Licuefacción de la gelatina - completa.

10 Todas las lecturas registradas 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.

15 Las designaciones del 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 MA-4638 para utilizar o asimilar diversos hidratos de carbono. Para este fin, el microorganismo se cultivó en un medio sintético basal (Pridham and Gottlieb) con
25 teniendo 1 % del 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 MA-4638; + indica crecimiento, + crecimiento pobre o cuestionable y - crecimiento nulo en comparación con un control negativo (sin fuente de carbono).

TABLA I

30	Glucosa	+	Maltosa	+
	Arabinosa	+	Manitol	+
	Celulosa	-	Mannosa	+

1

TABLA I (continuación)

Fructosa	+	Rafinosa	-
Inositol	-	Rammosa	+
Lactosa	+	Sacarosa	<u>+</u>
Xilosa	+		

5

El grado de crecimiento con las variaciones de temperatura y los requisitos de oxígeno del microorganismo son los siguientes:

10

Intervalo de temperatura (agar extracto de levadura-dextrosa + sales):

28°C - buen crecimiento vegetativo y aéreo

37°C - buen crecimiento vegetativo; ninguna hifa aérea

50°C - crecimiento nulo

15

Requisitos de oxígeno (cultivo en plancha en agar extracto de levadura-dextrosa + sales):

Aerobio.

20

Esta invención no se limita al organismo Streptomyces flavogriseus ni a los organismos que responden totalmente a las características anteriores de crecimiento y microscópicas que se dan con fines ilustrativos. Se desea y pretende incluir el uso de los mutantes producidos a partir del organismo descrito por diversos medios, tales como radiación X, radiación ultravioleta, mostaza nitrogenada, exposición a fagos y similares.

25

El 890A₁₀ es producido durante la fermentación aerobia, en condiciones controladas, de medios nutritivos acuosos adecuados inoculados con una cepa del organismo, Streptomyces flavogriseus. Los medios acuosos como los empleados para la producción de otros antibióticos son adecuados para la producción de 890A₁₀. Estos medios contienen fuer

30

1 tes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas asimilables por el microorganismo.

5 En general, pueden utilizarse hidratos de carbono como azúcares, por ejemplo dextrosa, glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, xilosa, manitol y similares y almidones como dextrina o tales como gramíneas, por ejemplo avena, centeno, almidón de maíz, harina de maíz y similares, solos o en combinación, como fuentes de carbono asimilable en el medio nutritivo. La cantidad de hidrato de carbono varía habitualmente entre alrededor de 1 y 6 % del peso del medio. Estas fuentes de carbono pueden utilizarse individualmente o pueden combinarse varias de estas fuentes de carbono en el medio. En general, pueden utilizarse muchos materiales proteicos como fuentes de nitrógeno en el proceso de fermentación. Las fuentes de nitrógeno adecuadas son, por ejemplo, hidrolizados de levadura, levadura primaria, harina de soja, harina de semilla de algodón, hidrolizados de caseína, licor de infusión de maíz, solubles de destilería o similares, siendo la fuente preferida los solubles de destilería. Las fuentes de nitrógeno, solas o en combinación, se emplean en cantidades que oscilan aproximadamente entre 0,2 y 6 % del peso del medio acuoso.

15 Entre las sales inorgánicas nutritivas que pueden incorporarse a los medios de cultivo están las sales acostumbradas capaces de suministrar iones sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, fosfato, sulfato, cloruro, carbonato y similares. También están incluidos los metales traza como cobalto, manganeso y hierro.

25 Los medios descritos en los ejemplos son simplemente ilustrativos de la amplia variedad de medios que pueden

30

1 emplearse y no se pretende que sean limitativos.

5 La fermentación se lleva a cabo a temperaturas comprendidas entre 20 y 37°C; sin embargo, para obtener resultados óptimos, es preferible efectuar la fermentación a temperaturas de unos 23 a unos 28°C. El pH inicial de los medios nutritivos adecuados para cultivar las cepas del Streptomyces flavogriseus y producir el antibiótico 890A₁₀ puede variar aproximadamente entre 6,0 y 8,0.

10 Aunque el nuevo antibiótico 890A₁₀ puede ser producido en cultivos superficiales y sumergidos, se prefiere realizar la fermentación en estado sumergido.

15 Es conveniente realizar una fermentación del antibiótico a pequeña escala por inoculación de un medio nutritivo adecuado con el cultivo productor de antibiótico y, después de trasegar a un medio de producción, permitir que transcurra la fermentación a una temperatura constante de unos 24°C en un sacudidor durante varios días.

20 La fermentación es iniciada en un matraz esterilizado de medio nutritivo a través de una o más fases de desarrollo de la simiente. El medio nutritivo para la fase de siembra puede ser cualquier combinación adecuada de fuentes de carbono y nitrógeno. El matraz de siembra se sacude en una cámara a temperatura constante de unos 28°C durante un día o hasta que el crecimiento es satisfactorio y se utiliza parte del cultivo resultante para inocular una segunda fase de siembra o el medio de producción. Cuando se utilizan matraces de siembra de fases intermedias, se desarrollan esencialmente igual; es decir, parte del contenido del matraz de la última fase de siembra se utiliza para inocular el medio de producción. Los matraces inoculados se sacuden

25

30

1 a temperatura constante durante varios días y al final del periodo de incubación, el contenido del matraz se centrifuga o se filtra.

5 Para el trabajo a gran escala, es preferible efectuar la fermentación en tanques adecuados provistos de un agitador y un medio para airear el medio de fermentación. De acuerdo con este método, el medio nutritivo se prepara en el tanque y se esteriliza calentando a temperaturas de hasta unos 120°C. Al enfriar, el medio esterilizado se inocula con una siembra previamente cultivada del cultivo productor y se permite que la fermentación transcurra durante un periodo de tiempo de, por ejemplo, 1 a 6 días mientras se agita y/o airea el medio nutritivo y se mantiene la temperatura alrededor de 22-26°C. Este método de producción del antibiótico 890A₁₀ es especialmente adecuado para la preparación de grandes cantidades del antibiótico.

15 Propiedades físicas y químicas del antibiótico 890A₁₀

20 El antibiótico 890A₁₀ es una sustancia ácida que migra hacia el polo positivo por electroforesis a pH neutro. A un gradiente de 50 voltios/cm en tampón de fosfato potásico 0,03M, pH 7,1, el antibiótico recorre 8,0 cm en 30 minutos, comparado con un movimiento de 4,0 cm para el 890A₁. La sal disódica es un polvo blanco o ligeramente amarillo cuando se liofiliza a partir de una solución acuosa. En 25 condiciones ácidas en solución acuosa, el antibiótico es inestable y no se ha aislado el ácido libre. La sal disódica del antibiótico 890A₁₀ presenta un máximo de absorción a 299 nm y un mínimo a 243 nm a pH neutro en agua. Para el preparado más purificado, el E % a 300 nm de la sal disódica es 30 214. La relación A₃₀₀/A₂₅₀ es 3,33 para la muestra más pu-

1 rificada. y la relación A_{300}/A_{220} es 2,05. Los indicios de
ligeras impurezas en esta muestra sugieren que las relacio-
nes correspondientes para una muestra de pureza definitiva
deben ser algo mayores. Más del 94 % de la absorción a 300
5 nm puede ser extinguida por reacción con hidroxilamina a
pH neutro. La absorbancia a 250 nm también disminuye por
reacción con hidroxilamina y la relación de la disminución
de absorbancia a 250 nm a la disminución a 300 nm es apro-
ximadamente 0,16. La reacción con hidroxilamina, seguida
10 por la disminución de A_{300} bajo las condiciones descritas
en la sección "Reacción con Hidroxilamina", es aparentemen-
te de primer orden, con un periodo de semiduración a la tem-
peratura ambiente de 23 a 60 segundos.

15 Cuando se mide frente a un patrón de antibiótico
 $890A_1$, el antibiótico $890A_{10}$ contiene 174 unidades de bio-
análisis por unidad de $HAEA_{300}$. El $HAEA_{300}$ está descrito en
la página 25 bajo la sección "Reacción con Hidroxilamina".

20 La Tabla II contiene las señales del espectro de
resonancia magnética nuclear a 100 MHz del $890A_{10}$ en D_2O
a $32^\circ C$. Los desplazamientos químicos están dados en ppm
con respecto al HOD a $4,70 \delta$ a $32^\circ C$ y las constantes de aco-
plamiento en hertzios.

TABLA II

25	\underline{CH}_3CH	1,55 (3H, d, 6,5 Hz)
	CH_3CO	2,02 (3H, s)
	$C_{(6)}-H$	3,89 (1H, d, d; $J_{6-5} = 5,4$ Hz; $J_{6-8} = 9,2$ Hz)
	$C_{(5)}-H$	$\sim 4,34$ (1H, d, t; $J_{5-6} = 5,5$ Hz; $J_{5-1} = 9,5$ Hz)
30	$C_{(8)}-H$	$\sim 4,8$ (parcialmente cubierto por la

1

de HOD

$C_{(1)}-H_2 \quad \sim 3,14 \text{ (1H, d, d; } \sim 9,2 + \sim 18 \text{ Hz)}$
 $\sim 3,33 \text{ (1H, d, d; } \sim 10 + 18 \text{ Hz)}$

5

$-CH_2NH \quad 3,43 \text{ (2H, t, 7 Hz)}$

$-CH_2-S- \quad 3,03 \text{ (2H, m).}$

El espectro de masas del TMSi-890A₁₀ se caracteriza por los fragmentos indicados en la Tabla III.

TABLA III

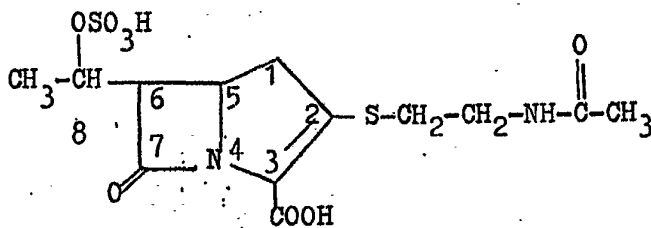
10

m/e	
86	
227,0224	$C_5H_{15}SO_4Si_2$, calculado: 227,0230
241	
300/1	
339,1325	$C_{15}H_{25}NO_4Si_2$, calculado: 339,1322
342,1444	$C_{15}H_{26}N_2O_3S Si$, calculado: 342,1433
368	
440	
458.	

15

El antibiótico 890A₁₀ tiene la siguiente estructura molecular:

20



(I)

25

El antibiótico 890A₁₀ se caracteriza además por los siguientes perfiles del espectro antibiótico.

El ensayo para determinar los perfiles del espectro antibiótico del antibiótico 890A₁₀ se realiza por aplicación de una gotita de 0,015 ml de una solución acuosa a 9,5 µg/ml del antibiótico sobre la superficie de una placa Petri de

30

1 100 x 15 mm que contiene 5 ml de agar nutritivo sembrado más
0,2 % de extracto de levadura, que se incubaba a 25°C. Los
resultados, expresados como diámetro en milímetros de la
zona de inhibición, están indicados en la Tabla IV.

5 TABLA IV

Organismo	Diámetro de la zona de inhibición, mm
<u>Bacillus</u> esp. MB n° 633	30
<u>Proteus vulgaris</u> MB n° 1012	19
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> MB n° 979	0
10 <u>Serratia marcescens</u> ATCC 890	15
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538 P	20
<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	30
<u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341	33
<u>Staphylococcus aureus</u> MB n° 698	23
15 <u>Streptococcus faecalis</u> MB n° 753	0
<u>Alcaligenes faecalis</u> ATCC 2130	24
<u>Brucella bronchiseptica</u> ATCC 4617	0
<u>Salmonella gallinarum</u> MB n° 1287	28
<u>Vibrio percolans</u> ATCC 8461	33
20 <u>Xanthomonas vesicatoria</u> MB n° 815	20
<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 21100	30
<u>Escherichia coli</u> MB n° 1418	25
<u>Pseudomonas stutzeri</u> ATCC 11607	0
<u>Klebsiella pneumoniae</u> MB n° 1264	19
25 <u>Aerobacter aerogenes</u> MB n° 835	22
<u>Erwinia atroseptica</u> ATCC 4446	10
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> MB n° 2824	0
<u>Corynebacterium pseudodiph.</u> ATCC 9742	12
<u>Escherichia coli</u> ATCC 9637	17
30 <u>Streptococcus faecium</u> MB n° 2820	0

TABLA IV (continuación)

Organismo	Diámetro de la zona de inhibición, mm
<u>Streptococcus agalactiae</u> MB n° 2875	29
<u>Vibrio percolans</u> MB n° 2566 (resistente a la cefalosporina C)	22
<u>Proteus vulgaris</u> MB n° 2112 (episoma)	30
<u>Proteus mirabilis</u> MB n° 3126	29
<u>Vibrio percolans</u> ATCC 8461 + 2×10^5 μ /ml de penicilinas	25
<u>Vibrio percolans</u> ATCC 8461 + β -lactamasa del <u>Enterobacter cloacae</u> MB 2646	34

El antibiótico 890A₁₀ es activo contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y es un potente inhibidor de las β -lactamasas bacterianas y puede encontrar utilidad en medicina humana y veterinaria. El 890A₁₀ puede utilizarse solo o en combinación con otras drogas antibacterianas para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, por ejemplo contra Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Salmonella schottmulleri.

El compuesto de esta invención también puede utilizarse en combinación con los antibióticos de β -lactama susceptibles a las β -lactamasas, para potenciar la acción de estos antibióticos de β -lactama por inhibición de la actividad lactamásica y prolongar así la duración de los antibióticos.

Así, una combinación del antibiótico 890A₁₀ con un antibiótico de β -lactama sensible a la lactamasa será más eficaz para el tratamiento de las infecciones de bacterias productoras de β -lactamasa que lo sería la misma cantidad de antibiótico sensible a la β -lactamasa por sí solo.

1 El antibiótico 890A₁₀ puede utilizarse como aditivo
para los piensos de animales, para la preservación de ali-
mentos y como desinfectante. Puede utilizarse en composicio-
5 nes acuosas cuya concentración oscila entre 0,1 y 100 par-
tes de antibiótico por millón de partes de solución o prefe-
riblemente a concentraciones que oscilan aproximadamente
entre 1 y 10 partes de antibiótico por millón de partes de
solución, con objeto de destruir e inhibir el crecimiento de
10 las bacterias perjudiciales sobre el equipo dental y médico
y como bactericidas en aplicaciones industriales.

El antibiótico 890A₁₀ puede utilizarse en preparados
farmacéuticos como único ingrediente activo o en combinación
con uno o más antibióticos o con una o más sustancias farma-
cológicamente activas.

15 El antibiótico puede ser administrado por vía oral,
tópica, intravenosa o intramuscular. Los métodos empleados
para la administración pueden ser los conocidos en este cam-
po o cualquier método al que pueda adaptarse el antibiótico
aquí descrito.

20 Asimismo, además de un vehículo, las composiciones
de esta invención pueden contener otros ingredientes como
estabilizantes, ligantes, antioxidantes, preservativos, lubri-
cantes, agentes suspensores, agentes de viscosidad o agentes
aromatizantes que son muy conocidos y comúnmente empleados.

25 En veterinaria, por ejemplo en el tratamiento de po-
llos, vacas, ovejas, cerdos y similares, la composición pue-
de ser formulada, por ejemplo, como preparado intramamario
en bases de acción prolongada o de liberación rápida.

30 La dosis a administrar depende en alto grado del esta-
do del sujeto en tratamiento, del peso del huésped y del tipo

1 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.

5 En el tratamiento de las infecciones bacterianas en
el hombre, el compuesto de esta invención puede ser co-ad-
ministrado con un antibiótico sensible a la β -lactamasa, oral
o parenteralmente, de acuerdo con los procedimientos conven-
cionales para la administración de antibióticos, siendo admi-
nistrado el antibiótico 890A₁₀ en una proporción de alrede-
10 dor de 2 a 600 mg/kg/día y preferiblemente alrededor de 5 a
100 mg/kg/día, en dosis preferiblemente fraccionadas, por
ejemplo tres o cuatro veces al día. Puede administrarse en
dosis unitarias que contienen, por ejemplo, 100, 330, 400 o
15 1000 mg de ingrediente activo, con vehículos o excipientes
adecuados y fisiológicamente aceptables. Las dosis unitarias
se encuentran en forma de preparados líquidos como solucio-
nes o suspensiones o en forma sólida en tabletas o cápsulas.
Naturalmente, se sobreentiende que la dosis óptima en cual-
quier caso dado dependerá del tipo y gravedad de la infec-
20 ción que ha de ser tratada y que se utilizarán dosis más pe-
queñas para uso pediátrico, siendo todos estos ajustes cono-
cidos por el experto en este campo.

25 Dentro de esta invención están incluidas las sales
no tóxicas y farmacéuticamente aceptables del compuesto
890A₁₀. Por ejemplo, las sales farmacológicamente aceptables
formadas con bases orgánicas e inorgánicas que incluyen, por
ejemplo, las sales metálicas derivadas de hidróxidos, carbo-
natos o bicarbonatos de metales alcalinos o alcalino-térreos,
tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio y calcio
30 y las sales derivadas de aminas primarias, secundarias o ter

1 ciarias como monoalquilaminas, dialquilaminas, trialquilami-
nas, alcanolaminas inferiores, dialcanolaminas inferiores,
alquilendiaminas inferiores, N,N-diaralquil-alquilen(infe-
rior)diaminas; aralquilaminas, amino-alcanoles inferiores,
5 N,N-dialquil(inferior)aminoalcanoles(inferiores), ácidos
amino-, poliamino- y guanidino-alcanoicos inferiores y ami-
nas heterocíclicas nitrogenadas. Son ejemplos representati-
vos las sales derivadas de hidróxido sódico, hidróxido amó-
nico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, carbonato po-
10 tásico, hidróxido potásico, carbonato cálcico, trimetilamina,
triethylamina, piperidina, N-etilpiperidina, morfolina, qui-
nina, lisina, protamina, arginina, procaína, etanolamina,
morfina, bencilamina, etilendiamina, N,N'-dibenciletilendi-
amina, dietanolamina, piperazina, dimetilaminoetanol, 2-ami-
15 no-2-metil-1-propanol, teofilina, N-metilglucamina y simi-
lares.

Las sales de los compuestos de esta invención pueden
ser aisladas directamente de los medios de fermentación uti-
lizando los eluyentes apropiados durante la cromatografía
20 de intercambio de ion o pueden ser preparadas por métodos
convencionales muy conocidos en este campo. Por ejemplo, las
disales, como la sal disódica, pueden obtenerse por trata-
miento de dos equivalentes de hidróxido sódico con un mol de
producto (I) en un disolvente adecuado. También pueden pre-
25 pararse sales mixtas con cationes monovalentes combinando un
mol de una base monovalente con un mol del producto (I) más
un equivalente de otra base. Alternativamente, pueden obte-
nerse sales monobásicas por tratamiento de un equivalente de
una base que contiene un catión monovalente con un mol del
30 producto (I). También pueden formarse sales por tratamiento

1 de un mol del producto con un mol de una base con un catión
divalente. Las sales de esta invención son derivados no tó-
xicos y farmacológicamente aceptables que pueden utilizarse
5 como ingrediente activo en formas farmacéuticas de dosis uni-
tarias adecuadas. Asimismo, pueden combinarse con otras dro-
gas para formar composiciones con un amplio espectro de
actividad.

10 Los caldos de fermentación que contienen el antibióti-
co 890A₁₀ producidos de acuerdo con los procedimientos des-
critos aquí, presentan actividades que oscilan aproximada-
mente entre 2 y 170 unidades por mililitro cuando se anali-
zan de acuerdo con el ensayo de difusión en disco utilizan-
do Vibrio percolans (ATCC 8461). El antibiótico 890A₁₀ con-
15 tenido en estos caldos de fermentación puede ser recupera-
do y purificado por diversos procedimientos. Uno de estos
procedimientos consiste en adsorber el antibiótico 890A₁₀
en una resina cambiadora de anión fuertemente básica. Son
ilustrativas de estas resinas cambiadoras de anión fuertemen-
te básicas las que contienen una matriz de estireno-divinil-
20 benceno, por ejemplo la resina de poliestireno y amonio cua-
ternario nuclear Dowex 1 x 2 (fabricada por Dow Chemical Co.,
Midland, Michigan) en el ciclo de cloruro. Otros miembros
representativos de esta clase de resinas cambiadoras fuerte-
mente básicas son los siguientes: Duolite A-40, A-42, A-101,
25 A-102 y A-114 (manufacturados por Chemical Process Co., Red-
wood City, California), Amberlite IRA-400, IRA-401 e IRA-410.
Alternativamente, puede utilizarse una resina cambiadora de
anión débilmente básica como el Amberlite IRA-68. (Las resi-
nas Amberlite son fabricadas por Rohm and Haas, Washington
30 Square, Filadelfia 5, Pensilvania).

1 El antibiótico adsorbido es fácilmente eluido de la
resina cambiadora de anión con soluciones salinas en meta-
nol acuoso al 80 % (v/v). El eluato así obtenido puede ser
5 purificado de nuevo por otros procedimientos de purifica-
ción. Así, el eluato puede ser purificado concentrándolo
y haciéndolo pasar por una columna rellena con un polímero
de poliestireno-divinilbenceno no polar, hidrófobo y reticu-
lado, tal como XAD-1, 2 y 4 o resinas de poliacrilamida como
XAD-7 y 8. Se prefiere el XAD-2. (XAD-1, 2, 4, 7 y 8 son
10 fabricados por Rohm and Haas, Washington Square, Filadelfia
5, Pensilvania).

Un método de obtención del antibiótico 890A₁₀ más pu-
rificado consiste en utilizar la filtración por gel a través
de un gel de poliacrilamida con un tamaño de poro que exclu-
15 ye las moléculas de peso molecular superior a 1800, tal co-
mo Bio-Gel, P-2 (fabricado por Bio-Rad, Richmond, Califor-
nia). También pueden emplearse para desalificar otros geles
como el Sephadex G-10.

20 El procedimiento preferido de obtención del antibió-
tico 890A₁₀ de gran pureza a partir de un caldo consiste en
centrifugar o filtrar el caldo para separar el sólido; adsor-
ber y eluir el filtrado de una resina cambiadora de anión co-
mo Dowex-1 x 2 en el ciclo de cloruro con NaCl al 3 % en
25 metanol acuoso al 80 % (v/v) que a la vez concentra y puri-
fica parcialmente el antibiótico; pasar por una columna de
XAD-2 adecuadamente preparada que retrasa el antibiótico y
con ello purifica y desalifica el eluato de Dowex-1 x 2. Se
reunen las fracciones enriquecidas en 890A₁₀ y se purifican
de nuevo. Mediante cromatografía en una resina Dowex-1 x 2
30 de -400 mallas, eluyendo con NaCl y/o NH₄Cl en metanol acuo-

1 so al 80 %, se obtiene un producto exento de la mayoría de
las impurezas absorbentes en ultravioleta (el NH_4Cl se uti-
liza para comunicar cierta capacidad de tamponamiento al
5 eluyente) y se separa el 890A₁₀ de otros antibióticos; por
desalificación sobre Bio-gel P-2 y Sephadex G-10 en metanol
al 50 %, se elimina la mayor parte de la sal introducida
en la cromatografía en Dowex-1 x 2.

10 Las impurezas residuales pueden reducirse mediante un
ciclo adicional de cromatografía sobre Dowex 1 x 2, -400 ma-
llas, eluyendo con una solución que contiene cloruro sódico
y metanol al 30 %, seguido de desalificación.

15 En la purificación por cromatografía en columna, en
general se combinan para purificarlas de nuevo solamente
aquellas fracciones del volumen eluido que contienen un
antibiótico del 30 % de pureza como mínimo como fracción
más pura. Los criterios de pureza son las relaciones de bio-
actividad/ A_{220} o A_{300}/A_{250} y $\text{HAEA}_{300}/A_{220}$ y, en los proce-
20 sos de desalificación, la conductividad. Así, en cada etapa
cromatográfica, se miden la A_{220} , A_{250} , A_{300} y la bioactivi-
dad de las fracciones apropiadas. Siempre que es posible,
se mide también la HAEA_{300} y, en la desalificación, se miden
las conductividades. Los criterios para decidir qué fraccio-
nes se combinan para las operaciones subsiguientes pueden
25 ser ajustados algo para conseguir un mayor rendimiento, a
expensas de la pureza o inversamente una mayor pureza a ex-
pensas del rendimiento.

30 En las operaciones a escala de laboratorio (menos de
20 litros de volumen de la muestra), todas las cromatografías
a excepción de la cromatografía en XAD-2 se realizan en un
recinto enfriado a 2-5°C. La cromatografía en XAD-2 se rea-

1 liza a la temperatura ambiente. El pH de las soluciones de
antibiótico que han de ser almacenadas se ajusta a 7-8 me-
diante adición cuidadosa de soluciones diluidas de NaOH o
5 HCl. Las soluciones acuosas se conservan en un frigorífico,
o preferiblemente en agua de hielo y las soluciones en me-
tanol al 50-80 % se conservan entre -20 y -60°C.

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

En la Figura 1 se encuentra un diagrama de flujo del
procedimiento de purificación para obtener el antibiótico
15 890A₁₀.

FIGURA 1

Esquema del procedimiento de purificación del antibiótico 890A₁₀

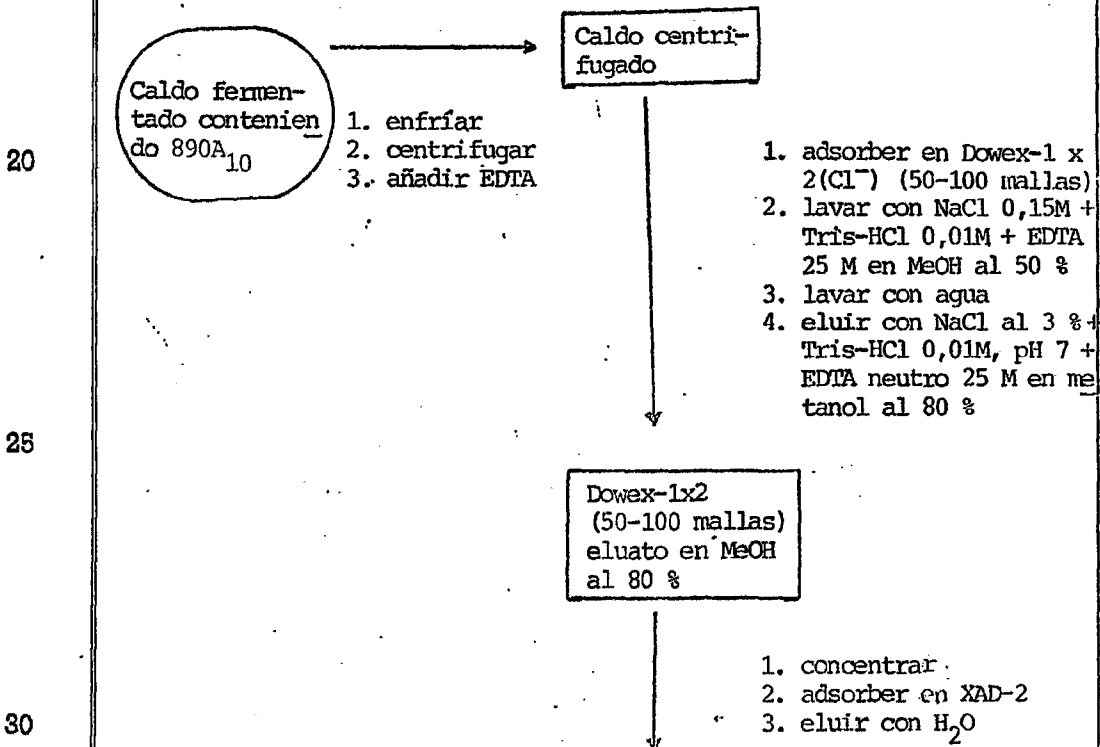
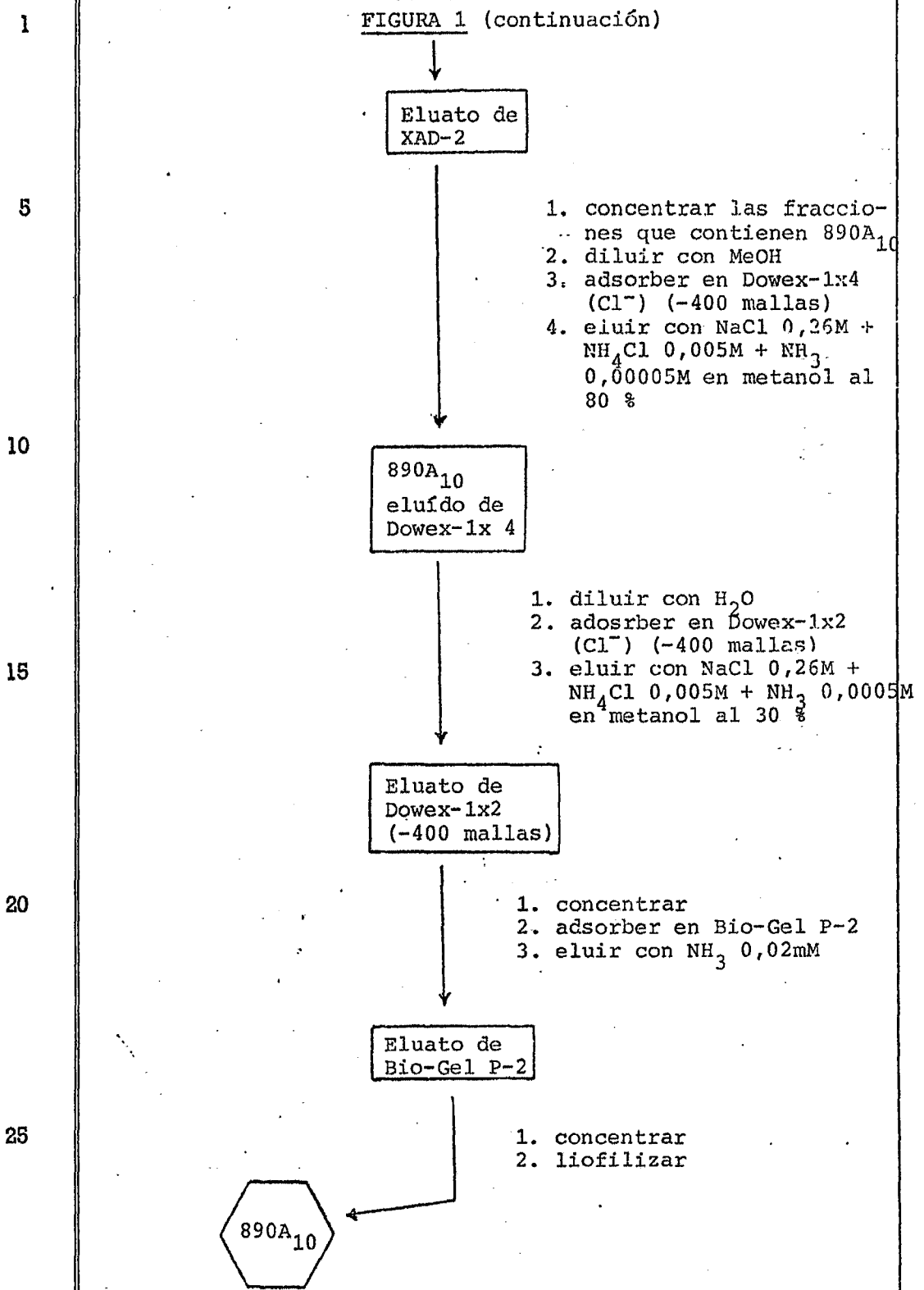


FIGURA 1 (continuación)



PROCEDIMIENTOS DE ANALISIS DEL ANTIBIOTICO 890A₁₀

I. Bioanálisis

Se emplea un método de difusión en disco-placa de agar

1 empleando Vibrio percolans ATCC 8461 como organismo de ensa-
yo. Se utiliza como patrón una muestra purificada del anti-
biótico 890A₁. El antibiótico 890A₁ se prepara por el proce-
dimiento indicado en el Ejemplo 6.

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

Se suspende un cultivo liofilizado de Vibrio percolans
ATCC 8461 en 15 ml de un medio esterilizado que contiene
8 g/litro de caldo nutritivo Difco y 2 g/litro de extracto
10 de levadura en agua destilada, "caldo nutritivo - extracto
de levadura" (denominado en lo que sigue NBYE). El cultivo
se incuba durante la noche en un sacudidor rotatorio a 28°C.
Este cultivo se utiliza para inocular la superficie de tubos
inclinados que contienen agar al 1,5 % en NBYE y los tubos
15 inclinados inoculados se incuban durante la noche a 28°C y
después se mantienen en un frigorífico.

Los tubos inclinados refrigerados, preparados a partir
de un solo cultivo liofilizado, se utilizan durante hasta
4 semanas a partir del momento de su preparación, como sigue:
20 se dispersan 4 ml de inoculum en 50 ml de NBYE introducidos
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 diluído a 1 litro
25 de NBYE conteniendo 15 g de agar y se mantiene a 46°C. El me-
dio que contiene el agar inoculado se vierte en placas Petri
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.

30 Unos discos de papel de filtro de 0,5" (12,7 mm) de

1 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 solución sobre un dis-
co seco y después colocando el disco sobre el agar. Se mide
5 el diámetro de la zona de inhibición después de la incuba-
ción adecuada (12-24 horas a 25°C). Si es necesario, se pre-
paran diluciones de las soluciones que han de ser analizadas
y un tampón de fosfato potásico 0,05M, pH 7,4, "tampón de
fosfato potásico" (denominado en lo que sigue KPB) o en
10 agua desionizada.

Los cálculos de las potencias se realizan como sigue:
se determina una pendiente midiendo los diámetros de zona de
una solución de antibiótico 890A₁₀ y de una dilución de
cuatro veces (en KPB) de esta solución. Se analizan dos dis-
15 cos de cada concentración sobre una sola placa y se determi-
na el tamaño medio de zona para cada concentración. La pen-
diente es igual a la mitad de la diferencia de los tamaños
medios de zona. Entonces se calculan las potencias mediante
la siguiente fórmula:

20

$$\text{Potencia (uni-} \\ \text{dades/ml)} = (\text{Potencia del Patrón}) \times \text{Dilución} \times 10$$

$$\left(\frac{[D-D_s] \log 2}{\text{pendiente}} \right)$$

donde D es el diámetro medio de las zonas formadas por la
incógnita, D_s es el diámetro medio de las zonas patrón, "Di-
25 lución" es el grado al cual se diluye la incógnita antes del
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. El 890A₁
puro se define por una potencia de 250 unidades por unidad
30 de absorbancia extingible por hidroxilamina a 300 nm, cuan-

1 do se utiliza como patrón.

II. Procedimiento de ensayo para determinar las "unidades de análisis 890"

5 Se emplea un método convencional de difusión en disco-placa de agar utilizando Vibrio percolans ATCC 8461 como organismo de ensayo. Como patrón se utiliza la cefaloridina. Se preparan las placas que contienen Vibrio percolans ATCC 8461 de la forma siguiente. Se incuba un cultivo de Vibrio percolans ATCC 8461 en caldo nutriente-extracto de levadura durante la noche, en un sacudidor rotatorio a 28°C y después se diluye hasta una densidad de 60 % de transmitancia a 660 nm. Se agregan 33,2 ml de este cultivo diluido a 1 litro de un medio constituido por agar nutritivo + 0,2 % de extracto de levadura, mantenido a 46°C. El medio que contiene agar inoculado 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 hasta 5 días antes de su uso.

15 Por análisis sobre placas preparadas como en el caso anterior, pero conteniendo 5 ml de medio inoculado por placa, se determina de la forma siguiente la concentración de cefaloridina que es equivalente a 1 unidad/ml de 890A₁. Cuatro concentraciones de cefaloridina constituyen el patrón: 3,12, 6,25, 12,5 y 25 mcg/ml, siendo la solución de referencia la 12,5 mcg/ml. Los diámetros de zona sobre una placa de 5 ml para el patrón son los siguientes:

Concentración (mcg/ml)	Diámetro de zona (mm)
3,12	16,8
6,25	22,3
12,5	25,0
25	29,6

30

1

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 ensayo, una concentración de 12,5 mcg/ml de cefaloridina se considera equivalente a una unidad de 890A₁ 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.

5

10

III. Reacción con hidroxilamina

El antibiótico 890A₁₀ reacciona con la hidroxilamina y produce una sustancia con una absorbancia a 300 nm considerablemente disminuída. Esto proporciona la base de un análisis cuantitativo del antibiótico 890A₁₀.

15

20

25

30

La solución a analizar 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 agregan 0,01 volúmenes de hidrocloreuro de hidroxilamina 1M y se mide la absorbancia a 300 nm a intervalos de 0,5 a 2 minutos. La reacción se lleva a cabo a la temperatura ambiente. Se supone una cinética de primer orden y el periodo de semiduración se estima a partir de la reducción de absorbancia durante los 10 primeros minutos. Para este periodo de semiduración, se calcula el tiempo transcurrido el cual deja de observarse disminución de la absorbancia y se prosiguen las observaciones más allá de este tiempo. Si ya no se observa ninguna nueva reducción una vez pasado este tiempo, la disminución total de absorbancia (corrigiendo el efecto de dilución y la absorbancia de la hidroxilamina) se toma como la "Absorbancia extingible por hidroxilamina a

1 300 nm (HAEA₃₀₀)". Si se observa una disminución de la absor-
bancia transcurrido el tiempo mencionado, se calcula la ve-
locidad de disminución de fondo de la absorbancia y la dis-
minución observada en ese momento se corrige teniendo en
5 cuenta la disminución de fondo, suponiendo que esta última
es lineal con el tiempo. Después se registra el valor corre-
gido como la HAEA₃₀₀.

El número de unidades HAEA₃₀₀ es igual a la HAEA₃₀₀
multiplicado por el volumen en mililitros.

10 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 debe
resultar evidente para el que posea la experiencia normal
en este campo que esta invención incluye los productos funci-
15 cionalmente 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 esta invención debe considerarse como constitutiva de
un método análogo. Los procedimientos descritos son suscep-
20 tibles de amplias variaciones y modificaciones y cualquier
desviación mínima o ampliación se considera al alcance del
experto y dentro de los límites de esta invención.

25 La preparación del antibiótico 890A₁ descrita en la
solicitud de patente estadounidense pendiente de Cassidy y
colaboradores, número de serie 634.300, presentada el 21
de Noviembre de 1975, se incorpora aquí por referencia.

EJEMPLO 1

30 Se utiliza un cultivo inclinado que contiene MA-4638 pa-
ra inocular un Erlenmeyer de 250 ml, provisto de tabiques,
que contiene 50 ml de Medio A.

1

Medio A

Dextrosa	10,0 g
Autolizado de levadura (Ardamine*)	10,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Tampón de fosfato**	2,0 ml
Agua destilada	1000 ml

pH 6,5

5

* Ardamine: Yeast Products, Inc.

10

** Solución tampón de fosfato:

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

15

Este matraz se sacude a 28°C en un sacudidor a 220 rpm con una órbita circular de 2" (5 cm) de diámetro, durante 2 días al cabo de los cuales el crecimiento es satisfactorio. Al cabo de 2 días, esta siembra se utiliza para inocular 3 Erlenmeyers de 250 ml que contienen 40 ml de Medio B, utilizando 2 ml por matraz (5 %).

20

Medio B

Pasta de tomate	20,0 g
Avena completa (molida)	20,0 g
Agua destilada	1000 ml

pH: ajustado a 7,0 con NaOH.

25

Estos matraces de producción se sacuden también a 28°C en un sacudidor de 220 rpm durante 4 días, realizándose análisis durante la fermentación. Al cabo de 3 días, una parte alícuota del sobrenadante del caldo centrifugado se somete a estudios de clasificación e identificación. Utilizando discos de análisis de 1/4" (6,3 mm) sobre placas de ensayo normales, este caldo da una zona de inhibición de 22 mm

30

1 frente a Proteus vulgaris y una zona de 15 mm frente a
5 Salmonella gallinarum. La bioautografía de un electroforeto-
grama del caldo centrifugado muestra dos componentes. La
mancha más pequeña que se mueve más rápida contiene 890A₁₀.

EJEMPLO 2

10 Dos viales congelados conteniendo 2 ml de inoculum
de MA-4638 se descongelan lentamente y el contenido se
transfiere asépticamente a 2 matraces de siembra que contie-
nen 500 ml. cada uno de Medio C. El matraz de siembra, que
es un matraz sacudido de tabique triple, de 2 litros, pro-
visto de un brazo lateral, se tapa con algodón.

Medio C

15	Autolizado de levadura (Ardamine*)	10,0 g
	Glucosa	10,0 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
	Tampón de fosfato**	2,0 ml
	Agua destilada	1000 ml

pH ajustado a 6,5 con NaOH antes
de esterilizar

20 * Ardamine: Yeast Products, In.

** Solución tampón de fosfato:

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

25 Los matraces de siembra inoculados se sacuden durante
24-30 horas a 28±1°C en un sacudidor giratorio a 210 rpm,
diámetro de la órbita circular 2" (5 cm).

30 El cultivo de los matraces de siembra se utiliza para
inocular dos fermentadores de vidrio de 14 litros, que con-
tienen 10 litros de medio de producción (Medio D más 0,15 %
de aceite de soja, v/v).

1

Medio D

5

Dextrina (almidón modificado CPC)	40,0 g
Solubles de destilería	7,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	50,0 mg
Agua destilada	1000 ml
pH ajustado a 7,3 con NaOH antes de esterilizar.	

10

Los fermentadores operan a 24°C, con una velocidad de agitación de 640 rpm (Kd alrededor de 5,5) y un caudal de aire de 0,5 VVM, durante 72 horas. Se utiliza el antiespumante Hodag-MF (Hodag Chemical Corp.) en la cantidad necesaria pero sin pasar del 0,1 %.

15

Después de la operación de fermentación se reúne el contenido de los dos fermentadores, que asciende a unos 20 litros.

20

Se centrifugan partes alícuotas de 200 ml del lote en una centrífuga Servall RC-2B a 9000 rpm, durante 20 minutos. El líquido que sobrenada se filtra a través de un lecho de 1 cm de Hyflo Super-Gel en un embudo Lapp de 13" (33 cm), con un filtro de tela. El filtrado tiene una bioactividad de 20 unidades/ml.

25

Se aplican 18 litros del caldo filtrado a una columna (8,2 x 29 cm) de Dowex-1x2 (Cl⁻), 50-100 mallas, a 150 ml/minuto. Después la columna se lava con 1 litro de agua desionizada seguido de 15 litros de NaCl 0,15M + tampón Tris-HCl 0,01M, pH 7,0 + EDTA neutro 25 µM en metanol al 50 %, a razón de 150 ml/minuto.

30

Después se eluye el antibiótico 890A₁₀ con NaCl al 3,2 % + tampón Tris-HCl 0,02M, pH 7,0 + EDTA neutro 25 µM en metanol al 80 %, a razón de 100 ml/minuto. Se recogen las

1 fracciones como sigue: una fracción de 1 litro, 4 fracciones
de 500 ml cada una y 12 fracciones de 1 litro cada una. Se
mide la bioactividad y la absorbancia a 220 nm en cada frac-
ción y se combinan para purificarlas más las fracciones que
5 presentan unas relaciones de bioactividad/ A_{220} superiores
a 0,6 unidades/unidad A_{220} y que también contienen más del
10 % de la actividad recuperada total por fracción. Así, se
combinan las fracciones 4 a 8, que contienen un total del
22 % de la bioactividad aplicada.

10 Las fracciones reunidas se concentran a presión redu-
cida hasta 190 ml, la sal precipitada se lava con agua des-
ionizada y las aguas de lavado se agregan al líquido que so-
brenada, llevando el volumen final a 220 ml. El concentrado
se ajusta a pH 6,5 con HCl y se aplica a una columna (6,0 x
15 59 cm) de Amberlite XAD-2 que ha sido previamente lavada con
8 litros de acetona acuosa al 60 %, seguido de 16 litros
de agua desionizada. Una vez completada la aplicación, la
columna se enjuaga cinco veces con 10 ml cada vez de agua
desionizada y el antibiótico se eluye con agua desionizada
20 a 35 ml/minuto. Se recogen fracciones como sigue: una frac-
ción de 500 ml seguida de 7 fracciones de 250 ml cada una y
después 4 fracciones de 500 ml.

25 Se miden los valores de la bioactividad y del $HAEA_{304}$
en las fracciones 3 a 12. Las fracciones 4 a 9 presentan
unas relaciones $HAEA_{304}/A_{220}$ superiores a 0,01 y se combinan
para purificarlas de nuevo. La fracción 3, que contiene alre-
dedor de un quinto de la sal aplicada, también se agrega
a esta mezcla. La mezcla combinada contiene 469 unidades
30 $HAEA_{304}$.

Las fracciones reunidas se diluyen a 4,1 litros y se

1 aplican a una columna (2,15 x 42 cm) de Dowex-1x4(Cl⁻), -400
 5 mallas, a 2 ml/minuto. La columna se lava con 100 ml de me-
 tanol al 50 % y el antibiótico se eluye con NaCl 0,25M +
 NH₄Cl 0,01M + NH₃ 0,0001M en metanol al 80 %, a razón de
 2 ml/minuto aproximadamente. Se recogen fracciones desde 8
 hasta 12 ml.

10 Se miden en cada quinta fracción la bioactividad y
 la absorbancia a 220 nm, 260 nm y 300 nm y en las fracciones
 de bioactividad máxima se mide la HAEA₃₀₀. La bioactividad
 del 890A₁₀ aparece en las fracciones 85 a 150, con un máximo
 en la fracción 120. Las fracciones con unos valores de la
 15 relación HAEA₃₀₀/A₃₀₀ superiores a 0,05 se combinan para puri-
 ficarlas de nuevo. Así, se combinan las fracciones 105 a
 133 que contienen un total de 130 unidades HAEA₃₀₀. Las frac-
 ciones combinadas 105 a 133 se diluyen hasta 1900 ml con
 agua desionizada y el pH se ajusta a 7,6. La muestra se apli-
 ca a una columna (2,15 x 42 cm) de Dowex-1x2(Cl⁻), -400 ma-
 20 llas, que ha sido previamente lavada con 3 litros de NaCl
 al 3 % en metanol al 50 %, seguido de 50 ml de metanol al
 50 %. Después de haber aplicado toda la muestra, la columna
 se lava con 100 ml de metanol al 30 % y se eluye a razón de
 2 ml/minuto con NaCl 0,26M + NH₄Cl 0,005M + NH₃ 0,0002M en
 metanol al 30 %. Se recogen fracciones de 10 a 12 ml.

25 El pico principal del antibiótico 890A₁₀ aparece en
 las fracciones 230 a 290, con un máximo en la fracción 260.
 Se combinan para purificarlas de nuevo las fracciones con una
 relación A₃₀₀/A₂₅₀ superior a 1,10 y una relación A₃₀₀/A₂₂₀
 superior a 0,83. Así, se combinan las fracciones 240 a 275
 30 que contienen 91,6 unidades HAEA₃₀₀.

Las fracciones combinadas 240 a 275 se concentran a

1 presión reducida hasta 10 ml y el concentrado se separa de
la sal precipitada mediante una pipeta. La sal se lava con
2 ml de agua desionizada y las aguas de lavado se agregan
al concentrado. Los 12 ml combinados del concentrado y de
5 las aguas de lavado se aplican a una columna (2,15 x 76 cm)
de Bio-Gel P-2 (200-400 mallas), que ha sido previamente la-
vada con 30 ml de NaCl saturado en agua desionizada, segui-
do de 1500 ml de agua desionizada y 50 ml de NH_3 0,05 mM
en agua desionizada. Una vez completada la aplicación, la
10 columna se lava tres veces con 1 ml cada vez de NH_3 0,05 mM
en agua desionizada y el antibiótico se eluye con NH_3 0,05 mM
en agua desionizada a 0,73 ml/minuto. Se recogen fracciones
de 3,65 ml cada una.

15 El pico principal de antibiótico 890A₁₀ aparece en
las fracciones 29 a 50, con un máximo en la fracción 35.
Las fracciones con una relación A_{300}/A_{250} superior a 1,9 y
también con una relación A_{300}/A_{220} superior a 1,45 se combi-
nan para someterlas a liofilización y análisis de RMN. Así,
se combinan las fracciones 36 a 45 que contienen 50,8 unida-
20 des A_{300} , de las cuales 45,1 son extinguidas por hidroxil-
amina.

Las fracciones 36 a 45 combinadas se concentran a pre-
sión reducida hasta 1 ml y se añaden 5 ml de D_2O . La muestra
se concentra de nuevo hasta 0,835 ml y 0,825 ml de éstos se
25 pasan a un vial de vidrio y se secan por congelación y lio-
filización. La muestra liofilizada contiene 48,2 unidades
 A_{300} y 4,6 mg de sólidos. Se denomina muestra 9441-154.

30 Se combinan las fracciones secundarias 31-34 y 46-49
para dar una "mezcla secundaria" que después se concentra a
1 ml, se congela rápidamente y se liofiliza. Estas fracciones

1 contienen 24 unidades A₃₀₀ de las cuales 17 son extingüibles por hidroxilamina. Esta muestra se denomina 9441-155.

EJEMPLO 3

5 Se descongela lentamente un vial congelado que contiene 2 ml de inoculum de MA-4638 y su contenido se transfiere asépticamente a un matraz de siembra que contiene 500 ml de Medio C. El matraz de siembra, que es un matraz sacudido de tabique triple, de 2 litros de capacidad, provisto de un brazo lateral, se tapa con algodón.

10

Medio C

Levadura autolizada (Ardamine*)	10,0 g
Glucosa	10,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Tampón de fosfato**	2,0 ml
15 Agua destilada	1000 ml
pH ajustado a 6,5 con NaOH antes de esterilizar.	

* Ardamine: Yeast Products, Inc.

** Solución tampón de fosfato:

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

25 El matraz de siembra inoculado se sacude durante 36 horas a 28±1°C en un sacudidor giratorio a 210 rpm, de 2" (5 cm) de diámetro de la órbita circular.

El cultivo de este matraz de siembra se utiliza para inocular un fermentador de vidrio de 14 litros que contiene 10 litros de medio de producción (Medio D más 0,15 % de aceite de soja, v/v).

30

1

Medio D

Dextrina (Almidón modificado CPC)	40,0 g
Solubles de destilería	7,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
5 CoCl ₂ .6H ₂ O	50,0 mg
Agua destilada	1000 ml

pH ajusta a 7,3 con NaOH antes de esterilizar.

10

El fermentador funciona a 24°C utilizando una velocidad de agitación de 550 rpm (Kd 3,0-3,5) y un caudal de aire de 0,5 VVM. Se utiliza la cantidad necesaria de anti-espumante Hodag-MF (Hodag Chemical Corp.) pero sin pasar de 0,1 %.

15

El caldo de cultivo se cosecha al cabo de 72 horas de fermentación.

Se centrifugan partes alícuotas de 200 ml del caldo en una centrífuga Servall RC-2 a 9000 rpm. El líquido que sobrenada contiene 7 litros con 39 unidades de bioanálisis por mililitro.

20

El líquido que sobrenada se filtra por un embudo Lapp que contiene una capa de 1 cm de Hyflo Super-Cel sobre un filtro de tela. A los 6,5 litros del filtrado se agregan 3,25 ml de EDTA neutro 0,1M y el filtrado se aplica después a una columna (8,2 x 21,5 cm) de Dowex-1x2(Cl⁻), 50-100 mallas, a 60 ml/minuto. Después de la aplicación, la columna se lava con 1 litro de agua desionizada y a continuación se lava con 12 litros de NaCl 0,15M + tampón de Tris-HCl 0,02M, pH 7,08 + EDTA 25 µM en metanol al 50 %, a 50 ml/minuto.

25

30

Después se eluye el antibiótico 890A₁₀ con 12,3 litros de NaCl al 3 % + tampón Tris-HCl 0,02M, pH 7,1 + EDTA

1 25 µM en metanol al 80 %, a 60 ml/minuto.

5 Se recogen fracciones como sigue: una fracción de 500 ml, cuatro fracciones de 200 ml cada una, doce fracciones de 500 ml cada una y cinco fracciones de 1 litro cada una. La bioactividad aparece en las fracciones 3 a 17, con un máximo en las fracciones 6, 7 y 8. Las fracciones con valores de bioactividad/A₂₂₀ superiores a 0,9 unidades/unidad A₂₂₀, que contienen también más del 8 % de la actividad recuperada total por fracción, se reúnen para purificarlas de nuevo. Así, se combinan las fracciones 6 a 12 que contienen 106.000 unidades de bioanálisis o 41 % de la bioactividad aplicada. Estas fracciones reunidas se mantienen a -60°C hasta que se combinan con las fracciones 6 a 13 procedentes de una segunda columna de Dowex, como se describe en el Ejemplo 4.

15 EJEMPLO 4

20 Dos viales congelados que contienen cada uno de ellos 2 ml de inoculum de MA-4638 se descongelan lentamente y su contenido se transfiere asépticamente a dos matraces de siembra que contienen cada uno 500 ml de Medio C. El matraz de siembra, un matraz sacudido de triple tabique, de 2 litros de capacidad, provisto de un brazo lateral, se tapa con algodón.

25 Medio C

Levadura autolizada (Ardamine*)	10,0 g
Glucosa	10,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Tampón de fosfato**	2,0 ml
Agua destilada	1000 ml
pH ajustado a 6,5 con NaOH antes de esterilizar.	

30

1 * Ardamine: Yeast Products, Inc.

** Solución tampón de fosfato:

KH_2PO_4 91,0 g

Na_2HPO_4 95,0 g

5 Agua destilada 1000 ml

Los matraces de siembra inoculados se sacuden durante 36 horas a $28^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ en un sacudidor giratorio a 210 rpm, 2" (5 cm) de diámetro de la órbita circular.

10 El cultivo de los matraces de siembra se utiliza para inocular dos fermentadores de vidrio de 14 litros, conteniendo cada uno de ellos 10 litros del medio de producción D.

Medio D

Dextrina (almidón modificado CPC) 40,0 g

Solubles de destilería 7,0 g

15 Extracto de levadura 5,0 g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50,0 mg

Agua destilada 1000 ml

pH ajustado a 7,3 con NaOH antes de esterilizar.

20 Se cargan dos fermentadores y se hacen funcionar a 24°C utilizando una velocidad de agitación de 550 rpm (Kd 3,0-3,5) y un caudal de aire de 0,5 VVM. Se utiliza la cantidad necesaria del antiespumante Polyglycol 2000, pero sin pasar del 0,1 %.

25 Los caldos de cultivo de los dos fermentadores se cosechan al cabo de 72 horas.

Se centrifugan unas partes alícuotas de 200 ml de los lotes de 10 litros en una centrífuga Servall a 9000 rpm, obteniéndose 9 litros de líquido sobrenadante de cada lote.

30 Los bioanálisis indican que el lote I contiene 23,4 unida-

1 des/ml y el lote II contiene 31,8 unidades/ml.

5 Se combinan y enfrían los lotes y se filtran a través de un lecho de 1 cm de Hyflo Super-Cel en un embudo Buchner de porcelana LabTek de 13" (33 cm). A los 15 litros de filtrado se agregan 7,5 ml de EDTA neutro 0,1M.

10 El filtrado se aplica a una columna (13,4 x 16 cm) de Dowex-1x2(Cl⁻), 50-100 mallas, a 100 ml/minuto. Una vez completada la aplicación, la columna se lava con 2 litros de agua desionizada y después con 20 litros de NaCl 0,15M + tampón Tris-HCl 0,01M, pH 7,01 + EDTA 25 µM en metanol al 50 %, a razón de 40-80 ml/minuto.

15 Después se eluye el antibiótico 890A₁₀ con 24,4 litros de una solución que contiene NaCl al 3 % + Tris-HCl 0,02M, pH 7,0 + EDTA 25 µM en metanol al 80 %, a 100 ml/minuto. Se recogen fracciones como sigue: una fracción de 800 ml, cuatro fracciones de 400 ml, doce fracciones de 1000 ml y cinco fracciones de 2000 ml.

20 La actividad antibiótica aparece en las fracciones 5 a 16, con un máximo en las fracciones 7 y 8. La actividad total en estas fracciones es de 212.000 unidades, igual al 51 % de la actividad aplicada. Las fracciones 6 a 13 se combinan para purificarlas de nuevo.

25 Las fracciones 6 a 13 combinadas de la columna Dowex se agregan a las fracciones 6 a 12 combinadas de la columna Dowex del Ejemplo3 y se concentran hasta 2,6 litros a presión reducida en un evaporador de tubo largo, con camisa de vapor. Este concentrado se reduce de nuevo a 300 ml por evaporación a presión reducida en un evaporador rotatorio y se filtran los cristales de sal precipitados.

30 El concentrado se ajusta a pH 6,48 por adición de 1,7

1 ml de ácido clorhídrico concentrado y después se aplica a
una columna (8,1 x 59 cm) de Amberlite XAD-2 y la columna.
se lava tres veces con 20 ml cada vez de agua desionizada.
El antibiótico se eluye con agua desionizada a un caudal de
5 60 ml/minuto. Se recogen fracciones como sigue: una fracción
de 1 litro, siete fracciones de 500 ml cada una y ocho frac-
ciones de 1000 ml cada una y se enfrían en hielo inmediata-
mente después de recogidas.

10 Se determinan para cada fracción los valores del bio-
análisis y de la HAEA₃₀₀, así como los valores de A₂₂₀,
A₂₆₀ y A₃₀₀. Las fracciones con unos valores de HAEA₃₀₀/A₃₀₀
superiores a 0,075 se combinan para seguir su tratamiento.
Así, se combinan las fracciones 5 a 9 que contienen 164.000
unidades de bioactividad.

15 Las fracciones reunidas se concentran a presión redu-
cida hasta 100 ml y se agregan 200 ml de metanol. Después
la muestra se aplica a una columna (2,15 x 38 cm) de Dowex-
1x4(Cl⁻), -400 mallas, a 2 ml/minuto. Después de aplicada la
muestra, la columna se lava con 100 ml de metanol al 80 % y
20 el antibiótico se eluye con NaCl 0,26M + NH₄Cl 0,005M + NH₃
0,00005M en metanol al 80 %, a 2 ml/minuto. Se recogen frac-
ciones de 10 ml cada una.

25 Cada quinta fracción se miden las bioactividades y los
valores de A₃₀₀, A₂₅₀, A₂₂₀ y HAEA₃₀₀. Se combinan para pu-
rificarlas de nuevo las fracciones con unas relaciones HAEA₃₀₀/
A₂₂₀ superiores a 0,07. Así, se combinan las fracciones 125
a 150.

30 A las fracciones 125 a 150 combinadas, procedentes de
la columna de Dowex 1x4, se agrega la muestra liofilizada
9441-155 del Ejemplo 2, redisuelta en 1,0 ml de agua desioni-

1 zada. Esta muestra combinada se diluye hasta 1900 ml con agua
desionizada y se aplica a una columna de Dowex-1x2 (Cl⁻)
(2,15 x 40 cm, -400 mallas), a 2 ml/minuto. La columna se
5 lava con 150 ml de metanol al 30 % y después se eluye el
antibiótico con 6 litros de NaCl 0,25M + NH₄Cl 0,005M + NH₃
0,00005M en metanol al 30 %, a 2 ml/minuto. Se recogen frac-
ciones de 11,1 ml cada una.

10 Se mide la absorbancia a 300 nm, 250 nm y 220 nm para
cada quinta fracción. El pico principal de antibiótico 890A₁₀
aparece en las fracciones 360 a 430, con un máximo en las
fracciones 394-400. Se combinan todas las fracciones con una
relación A₃₀₀/A₂₂₀ superior a 1,30 para purificarlas de
nuevo. Así, se combinan las fracciones 380 a 420. Estas frac-
15 ciones combinadas contienen 202 unidades A₃₀₀, de las cuales
197 son extingüibles por hidroxilamina.

20 A las fracciones 380 a 420 combinadas se añade la
muestra 9441-154 del Ejemplo 2, que se ha disuelto en 1 ml
de D₂O más 4 ml de agua desionizada y que contiene 30,5 uni-
dades HAEA₃₀₀. La muestra combinada se diluye a 2,0 litros
con agua desionizada y se aplica a una columna (2,15 x 41 cm
de Dowex-1x2 (Cl⁻), 200-400 mallas, a 0,6-2 ml/minuto. La
columna se lava con 360 ml de metanol al 30 % y el antibióti-
25 co 890A₁₀ se eluye con NaCl 0,25M + NH₄Cl 0,005M + NH₃
0,00005M en metanol al 30 %, a 1,9 ml/minuto. Se recogen
fracciones de 9,7 ml.

30 Se mide la absorbancia a 300 nm, 250 nm y 220 nm para
cada quinta fracción. El pico principal de antibiótico 890A₁₀
determinado por la absorbancia a 300 nm, aparece en las frac-
ciones 270 a 358, con un máximo en la fracción 315. Las frac-
ciones con relaciones A₃₀₀/A₂₂₀ superiores a 1,75 se combi-

1 nan para purificarlas de nuevo. Así, se combinan las fraccio-
nes 295 a 335 que contienen 145 unidades A_{300} , de las cuales
137 son extingüibles por hidroxilamina.

5 Las fracciones 295 a 335 combinadas se concentran a
presión reducida hasta 10 ml y el concentrado se ajusta a
pH 7,0 con NaOH 1M. El concentrado se aplica a una columna
(2,15 x 75 cm) de Bio-Gel P-2, 200-400 mallas y la columna
se enjuaga tres veces con 1 ml cada vez de agua desionizada.
El antibiótico se eluye con agua desionizada a 0,6 ml/minu-
10 to. Se recogen fracciones de 6,4 ml cada una.

Los valores de la absorbancia a 300 nm, 250 nm y 220
nm, así como las conductividades, se miden en cada segunda
fracción. El pico principal de absorbancia a 300 nm aparecen
las fracciones 9 a 27, con un máximo en la fracción 14. Las
15 fracciones 11 a 16 tienen unas conductividades proporciona-
les al valor de la A_{300} y se combinan para el análisis espec-
trométrico de masas y de RMN. Esta mezcla contiene 75,4 uni-
dades A_{300} en 38,7 ml. De éstos, se concentran 34,7 ml a
1,22 ml. Una fracción de 1,20 ml de este concentrado se con-
20 gela y liofiliza para el análisis de RMN, dando 2,84 mg de
sólido. Los 4 ml restantes se convierten en la forma NH_4^+
haciéndolos pasar por una columna (0,7 x 15 cm) de Dowex-50
Wx2 (NH_4^+), 200-400 mallas. La sal amónica resultante se con-
centra a 0,11 ml, se separan 10 μ l, se añaden 100 μ l de agua
desionizada y se separan cuatro muestras de 40 ml que se con-
25 gelan individualmente y liofilizan para el análisis espec-
tro métrico de masas (9441-209-2).

También se concentran hasta 1 ml las fracciones de
30 Bio-Gel 17 a 23, que contienen 29,4 unidades A_{300} , se conge-
lan y se liofilizan, dando 1,80 mg de sólidos.

EJEMPLO 5

Se descongelan lentamente dos viales congelados que contienen 1 ml cada uno de caldo de cultivo de MA-4638 y su contenido se transfiere asépticamente a dos Erlenmeyers de tabique triple, de 250 ml, conteniendo cada uno de ellos 50 ml de medio de siembra C. Los Erlenmeyers se tapan con algodón.

Medio C

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

pH ajustado a 6,5 con NaOH antes de tratar en autoclave.

* Ardamine: Yeast Products, Inc.

** Solución tampón de fosfato:

KH₂PO₄ 91,0 g

Na₂HPO₄ 95,0 g

Agua destilada 1000 ml

Dos matraces de siembra se sacuden durante 20-24 horas a 28±1°C en un sacudidor giratorio a 210 rpm, de 2" (5 cm) de diámetro de la órbita circular. Después se reúne el contenido de los matraces y se utiliza para inocular los matraces de producción.

Se inoculan 10 matraces sacudidos con tabiques, de 2 litros, conteniendo cada uno de ellos 300 ml de Medio D de producción, con 10 ml por matraz del caldo del matraz de siembra. Los matraces de producción anteriores se cubren con tapas de gasa.

1

Medio D

Dextrina (almidón modificado CPC) 40,0 g

Solubles de destilería 7,0 g

Extracto de levadura 5,0 g

5

CoCl₂·6H₂O 50,0 mg

Agua destilada 1000 ml

pH ajustado a 7,3 con NaOH antes de tratar en autoclave.

10

Después de inocular, los matraces de producción se incuban a 24±1°C con sacudidas en un sacudidor giratorio a 210 rpm, 2" (5 cm) de diámetro de la órbita circular, durante 3 días. Se cosechan los matraces, se reúne el contenido y se determina la actividad del caldo.

Edad de la cosecha (horas) 72

15

pH 6,5

Análisis 890 (unidades/ml) 30,45

20

Se centrifugan 2 litros de caldo completo de los matraces de producción D anteriores en porciones de 200 ml a 9000 rpm, para dar 1,7 litros de líquido sobrenadante a pH 6,8.

25

El líquido sobrenadante se aplica a una columna de Dowex-1x2(Cl⁻), 50-100 mallas, dimensiones del lecho: 3,9 x 25 cm, a un caudal de 5-10 ml/minuto. La columna se lava con 50 ml de agua desionizada, seguido de 2 litros de NaCl 0,15M + tampón Tris-HCl 0,02M, pH 7,0 + EDTA neutro 25 μM en metanol acuoso al 50 % (v/v).

30

Después el producto se eluye con 30 g/litro de NaCl + tampón Tris-HCl 0,02M, pH 7,0 + EDTA 25 μM en metanol acuoso al 80 % (v/v), a un caudal de 5 ml/minuto. Se recogen fracciones de 10 ml.

1 La bioactividad aparece en las fracciones 5 a 180,
con un máximo en las fracciones 25 a 70. Se combinan las
fracciones 12 a 105 y se concentran hasta 15 ml bajo presión
reducida. El pH se ajusta a 6,5 con HCl 1M y el concentrado
5 se aplica a una columna (3,4 x 55 cm) de XAD-2 que ha sido
lavada con 2,5 litros de acetona acuosa al 70 % (v/v), 2,5
litros de agua desionizada y 2,5 litros de NaCl al 5 % en
agua desionizada. La columna se lava tres veces con 5 ml ca-
da vez de agua desionizada y se eluye con agua desionizada
10 a 10 ml/minuto. Se recogen fracciones de 10 ml.

La bioactividad aparece en las fracciones 32 a 270,
con un máximo en las fracciones 42 a 62. La bioactividad to-
tal que eluye es el 25 % de la actividad del caldo original.
Se combinan las fracciones 40 a 240 y se agregan las fraccio-
15 nes 12 a 34 de la columna XAD-2 combinadas y reservadas. Las
fracciones combinadas totales se concentran a presión redu-
cida a 50 ml, y contienen 120 unidades HAEA₃₀₄.

El concentrado se diluye con 200 ml de metanol y se
aplica a razón de 2 ml/minuto a una columna (2,15 x 40 cm)
20 de Dowex-1x4, -400 mallas, que ha sido previamente lavada con
2 litros de 30 g/l de NaCl en metanol acuoso al 80 % y 1 li-
tro de metanol acuoso al 80 %. Después de aplicada la muestra,
la columna se lava con 100 ml de metanol acuoso al 80 % (v/v)
y se eluye con 2,5 litros de NaCl 0,22M + NH₄Cl 0,01M + NH₃
25 0,0002M en metanol acuoso al 80 (v/v), seguido de 3 litros
de NaCl 0,31M + NH₄Cl 0,01M + NH₃ 0,0002M en metanol acuoso
al 80 % (v/v). El caudal es de 2 ml/minuto y se recogen frac-
ciones de 10 ml cada una.

30 El antibiótico 890A₁₀ se separa en la columna Dowex-
1x4, eluido en las fracciones 155 a 195, como se determina

1 por análisis sobre ATCC 8461.

EJEMPLO 6

Antibiótico 890A₁

5 Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado de Streptomyces flavogriseus MA-4600 NRRL 8140 y el contenido se suspende en un tubo que contiene 1,5 ml de Medio E estéril con la siguiente composición.

Medio E

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

15 ** Solución tampón de fosfato:

	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 1 Erlenmeyer de siembra de tabique triple, de 250 ml, que contiene 54 ml de Medio C de siembra con la siguiente composición.

Medio C

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 Product Corporation

30 ** Solución tampón de fosfato:

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

1 Na_2HPO_4 95,0 g
 Agua destilada 1000 ml

5 El matraz de siembra se tapa con algodón y se sacude durante 30 horas a $28^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ en un sacudidor giratorio a 220 rpm, diámetro 2" (5 cm).

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

10 Medio F

 Pasta de tomate 20,0 g
 Levadura primaria 10,0 g
 Dextrina (Amidex) 20,0 g
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5,0 mg
15 Agua destilada 1000 ml
 pH ajustado a 7,2-7,4 con NaOH.

 Después de inocular, los matraces de producción se incuban a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ sacudiendo en un sacudidor giratorio a 220 rpm, diámetro 2" (5 cm), durante 3 días. Se determina la actividad de los matraces frente a placas de ensayo patrón de Vibrio percolans ATCC 8461, empleando discos de ensayo de 0,5" (12,7 mm) sumergidos en las muestras de caldo de fermentación centrifugado. Las muestras se diluyen con tampón de fosfato 0,05M, pH 7,4. Los resultados están tabulados a continuación.

25 Edad de la cosecha, horas 72
 pH 6,4
 Análisis con Vibrio percolans
 (dilución 1/100) 23 mm
30 Análisis 890, unidades/ml 103

1 El caldo completo se centrifuga en porciones de 200
ml en frascos de policarbonato a 9000 rpm, durante 15 minu-
tos, para dar 1600 ml de líquidos sobrenadantes combinados
con una potencia de 104 unidades/ml. A esta mezcla se aña-
5 den 0,5 ml de EDTA neutro 0,1M.

El caldo centrifugado se adsorbe en una columna de
Dowex-1x2(Cl⁻), 50-100 mallas, dimensiones del lecho: 3,8 x
22 cm, a una caudal de 6 a 20 ml/minuto. La columna se lava
con 100 ml de agua desionizada y se eluye con 1 litro de agua
10 desionizada que contiene 50 g de cloruro sódico, tampón
Tris-HCl 0,02M, pH 7,0 y EDTA neutro 25 µM; a un caudal de
6 ml/minuto. Se recogen fracciones de 10 ml.

El antibiótico 890A₁ aparece en las fracciones 13 a
81, con un máximo en las fracciones 25 a 33, contando a par-
15 tir de la primera aplicación del eluato salino. Se combinan
las fracciones 24 a 41, que presentan las máximas relaciones
de biopotencia/A₂₂₀, para posterior tratamiento. Las fraccio-
nes combinadas contienen un total de 29.000 unidades o el
17 % de la bioactividad aplicada.

20 El eluato de Dowex se concentra a 10 ml, se ajusta el
pH a 6,5 con ácido clorhídrico diluído y el concentrado se
aplica a una columna de XAD-2, dimensiones del lecho: 3,3 x
36 cm, que ha sido previamente lavado con 2 litros de aceto-
25 na acuosa al 60 %, 2 litros de agua desionizada y 2 litros
de cloruro sódico al 5 % (peso/volumen) con agua desioniza-
da. La muestra se eluye con agua desionizada a un caudal de
6 ml/minuto. Se recogen fracciones de 40 a 260 ml.

30 La actividad antibiótica aparece en las fracciones 6
a 14, que se extienden desde 220 hasta 2560 ml del volumen
eluído. El pico se encuentra en las fracciones 9 y 10, que

1 se extienden desde 370 hasta 590 ml de volumen eluído. Las
fracciones 9 a 12, que se extienden desde 370 a 1060 ml de
volumen eluído, presentan las máximas relaciones de HAEA₃₀₀/
A₂₂₀ y se combinan para tratarlas de nuevo. Estas fracciones
5 contienen 36.600 unidades, igual al 126 % de la actividad
aplicada aparente.

Las fracciones 9 a 12 combinadas se concentran a 100
ml y el concentrado se aplica a una columna de Dowex-1x4(Cl⁻),
-400 mallas, dimensiones del lecho: 2,2 x 41 cm, a un caudal
10 de 2 ml/minuto. La columna se lava con 50 ml de agua desioni-
zada y se eluye con 3 litros de NaCl 0,07M + NH₄Cl 0,005M +
NH₃ 0,0001M en agua desionizada, a una caudal de 2 ml/minuto.
Se recogen fracciones de 10,8 ml, a partir de la primera apli-
cación del eluyente.

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

20 Las fracciones combinadas se concentran a 4,0 ml y el
pH se ajusta a 7,3 por adición de 16 µl de NaOH 1M. El con-
centrado se aplica a una columna de Bio-Gel P-2, 200-400 ma-
llas, dimensiones del lecho: 2,15 x 70 cm, y se lava tres ve-
ces con 1 ml cada vez de agua desionizada y se eluye con
agua desionizada a 0,96 ml/minuto. Se recogen fracciones de
25 3,85 ml.

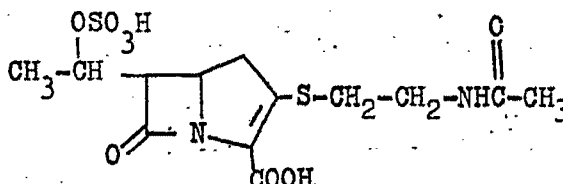
30 El pico principal de antibiótico 890A₁ aparece en las
fracciones 24 a 44, con un máximo en las fracciones 33 y 34.
Se combinan las fracciones 27 a 38, con las relaciones máxi-
mas de A₃₀₀/A₂₄₅, para liofilizarlas. Estas fracciones combi-
nadas contienen un total de 72 unidades A₃₀₀.

1 Para efectuar la liofilización, las fracciones combi-
nadas se concentran a 3,0 ml y el pH del concentrado se ajust
5 ta a 7,5 por adición de 10 µl de NaOH 0,1M. La muestra se
divide en dos porciones de 1,50 ml cada una y las porciones
se congelan rápidamente independientemente y se liofilizan
en viales de vidrio de 14 ml, tapados a rosca. Cada muestra
contiene 1,73 mg de 890A₁, correspondientes a 35,8 unidades
A₃₀₀.

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

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la preparación del anti-
biótico 890A₁₀ de fórmula



20 y sus sales farmacéuticamente aceptables, cuyo procedi-
miento consiste en cultivar una cepa productora de 890A₁₀
de Streptomyces flavogriseus en un medio nutritivo acuoso
que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y
sales inorgánicas, en condiciones aerobias sumergidas y
25 recuperar dicho antibiótico.

3.- Un procedimiento según la Reivindicación 1,
donde el microorganismo cultivado es Streptomyces flavo-
griseus NRRL 11,020.

30 3.- Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:

1 " UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL ANTIBIOTICO
890A₁₀".

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de cincuenta y una
páginas mecanografiadas.

Madrid, 8 de Noviembre de 1977

BERNARDO UNGRIA

p.p.



10

15

20

25

30