

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

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

ES

11

21

22

NUMERO	466.646
FECHA DE PRESENTACION	3 febrero 1.978

A1

PATENTE DE INVENCION

40 PRIORIDADES:		
41 NUMERO	42 FECHA	43 PAIS
767.723	11.2.1977	Estados Unidos.
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07 D 13/02; A61K 31/71	
64 TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE DESACETIL 890A ₁₀		
71 SOLICITANTE (S)		
MERCK & CO., INC.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey - ESTADOS UNIDOS.		
72 INVENTOR (ES)		
Jean S. Kahan y Frederick M. Kahan.		
73 TITULAR (ES)		
El mismo solicitante.		
74 REPRESENTANTE		
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.		

COMPENDIO DE LA INVENCION

1
5
Esta invención se refiere a un nuevo agente antibiótico. Más especialmente, se refiere a la nueva sustancia antibiótica denominada aquí desacetil-890A₁₀. La invención comprende el antibiótico en formas diluidas, como concentrados crudos y en formas puras.

10
Un objeto de esta invención es proporcionar el nuevo y útil antibiótico que es muy eficaz en la inhibición del crecimiento de diversos microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos. Otro objeto es proporcionar un procedimiento para la preparación de esta nueva sustancia antibiótica por desacetilación enzimática del compuesto 890A₁₀. Otros objetos resultarán evidentes en la descripción detallada de esta invención que se da a continuación.

15
20
25
La nueva sustancia antibiótica de esta invención se produce por hidrólisis del grupo N-acetilo del compuesto 890A₁₀, utilizando una amidohidrolasa capaz de hidrolizar al grupo N-acetilo. Una fuente conveniente de amidohidrolasa con esta capacidad son las cepas productoras de amidohidrolasa del microorganismo Protaminobacter ruber. El enzima particular producido por el Protaminobacter ruber es la N-acetil-890A₁₀-amidohidrolasa, un miembro del subgrupo de enzimas designado E.C. 3.5.1 de acuerdo con la nomenclatura de las enzimas recomendada por la International Union of Pure and Applied Chemistry y la International Union of Biochemistry.

30
El microorganismo capaz de realizar el proceso de desacetilación se aisló de una muestra de tierra y, basándose en estudios taxonómicos, fué identificado como perteneciente a la especie Protaminobacter ruber y ha sido denomi-

1 nado MB-3528 en la colección de cultivos de Merck & Co., Inc.,
Rahway, New Jersey. Un cultivo del mismo se ha colocado en
deposición permanente sin restricciones en la colección de
cultivos de los Northern Regional Research Laboratories,
5 Northern Utilization Research and Development Division,
Agricultural Research Service, Departamento de Agricultura
de Estados Unidos, Peoria, Illinois y ha recibido el número
de accesoión NRRL B-8143.

10 Las características morfológicas y de cultivo del
Protaminobacter ruber NRRL B-8143 así como la utilización
de carbono y nitrógeno y las reacciones bioquímicas del mis-
mo son las siguientes:

15 Morfología - Células en forma de bastoncillo con ex-
tremos redondeados, de 0,9-1,2 x 2,3-4,6 micras, que apare-
cen individualmente o en parejas. Las células de 24 y 48 ho-
ras producen una mancha Gram-negativa con un aspecto granu-
lado. Los gránulos, especialmente los gránulos polares, pro-
ducen una mancha negra con el Negro Sudan B. Las células son
móviles a 28°C pero la motilidad es cuestionable a 37°C.

20 Características de cultivo - Las colonias en agar nu-
triente son al principio delgadas, puntiformes, semitranspa-
rentes e incoloras; después adquieren un aspecto convexo ba-
jo, opaco, liso, de bordes completos, de consistencia algo
seca y con pigmentación entre rosa y rojo rosáceo.

25 Los cultivos en caldo nutritivo son uniformemente tur-
bios sin formación de película.

30 La producción de pigmento no depende de la luz ni de
las temperaturas utilizadas (28°C y 37°C). El pigmento es
soluble en acetona pero insoluble en agua o cloroformo.

El crecimiento sobre agar nutritivo y sobre agar infu-

1
sión de cerebro-corazón en condiciones aerobias es algo lento pero bueno a 28°C; el crecimiento es entre moderado y bueno pero más lento a 37°C y a 50°C no se produce crecimiento.

5
Utilización de las fuentes de carbono y nitrógeno

Empleando un medio basal de sales, con sulfato amónico como fuente de nitrógeno, el crecimiento es bueno con arabinosa, moderado con xilosa y malo con dextrosa, fructosa, manosa, ramnosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, celulosa, inositol y manitol.

10
Puede utilizarse N-acetiletanolamina como única fuente de carbono y nitrógeno.

15
No se produce ningún ácido ni gas a partir de dextrosa o lactosa en medio basal OF (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) en condiciones aerobias o anaerobias.

Reacciones bioquímicas

20
Las reacciones bioquímicas se basan en métodos normalizados como los descritos en Manual of Microbiological Methods, editado por la Society of American Bacteriologists, McGraw-Hill Book Co., New York, 1957.

Catalasa - positiva

Oxidasa - negativa.

No se hidroliza el almidón

No se hidroliza la caseína

25
No se licúa la gelatina

La leche de tornasol mantiene su consistencia pero se vuelve ligeramente alcalina al cabo de 7 días

Indol - negativa

30
H₂S - negativa

No se reducen los nitratos

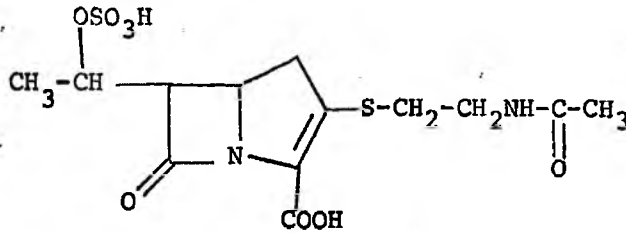
1

Ureasa - positiva

Lisin- y ornitin-descarboxilasa - negativa.

El término 890A₁₀ es aplicado al antibiótico de la siguiente estructura:

5



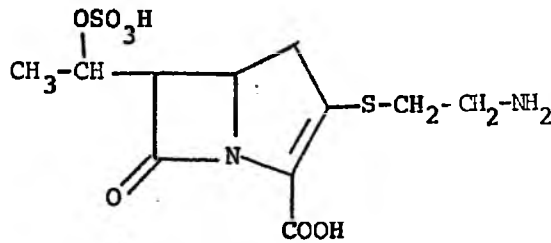
10

El producto 890A₁₀, su descripción y los procedimientos para su producción están descritos en la solicitud de patente estadounidense número de serie 742.958 de Cassidy y colaboradores, presentada el 17 de Noviembre de 1976, que se incorpora aquí por referencia.

15

El nuevo antibiótico de esta invención, desacetil-890A₁₀ tiene la siguiente fórmula estructural:

20

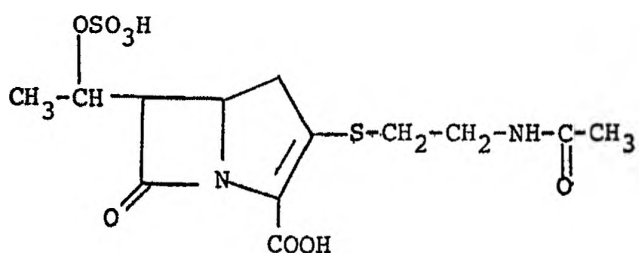


y se prepara por hidrólisis enzimática del 890A₁₀, utilizando una amidohidrolasa presente en las especies del género Protaminobacter.

25

El nuevo procedimiento de esta invención se refiere a la escisión del grupo N-acetilo del compuesto de estructura:

30



10 que consiste en mezclar íntimamente dicho compuesto con una amidohidrolasa capaz de hidrolizar al grupo N-acetiló. Más específicamente, el procedimiento de esta invención produce la N-desacetilación del compuesto 890A₁₀ por contacto íntimo de dicho compuesto con la amidohidrolasa, N-acetil-890A₁₀-amidohidrolasa.

15 Se establece una homología inesperada entre la N-acetiletanolamina y el producto 890A₁₀ ya que los extractos de microorganismos con el enzima N-acetiletanolamino-amidohidrolasa son en muchos casos capaces de hidrolizar el producto 890A₁₀.

El compuesto 890A₁₀ se prepara por fermentación de un caldo con el microorganismo Streptomyces flavogriseus.

20 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 MA-4638 en la colección de cultivos de Merck & Co., Inc., Rahway, N.J. Un cultivo del mismo se ha colocado en depósito permanente sin restricciones en cuanto 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 Unidos, Peoria, Ill., y está a disposición del público bajo el número de accesoión NRRL 11020.

25

30

1 El Streptomyces flavogriseus MA-4638 produce el anti-
biótico 890A₁₀ que se aísla en forma esencialmente pura del
caldo de fermentación.

5 Las características morfológicas y de cultivo del
Streptomyces flavogriseus MA-4638 están indicadas en la
siguiente tabla.

Morfología

10 Los esporóforos son cadenas ramificadas, entre rectas
y flexuosas, de esporas formando mechones. Las cadenas tie-
nen una longitud de más de 10 esporas. Las esporas son entre
esféricas y ovals - 0,9 x 1,2 (970x).

Características de cultivo

Agar harina de avena (medio ISP 3)

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

Micelio aéreo - gris claro bordeado de gris medio

Pigmento soluble - ninguno

Agar Czapek-Dox (agar sacarosa-nitrato)

20 Crecimiento vegetativo - reverso marrón bordeado de ma-
rrón oscuro;

Micelio aéreo - gris medio, aterciopelado;

Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio.

Agar albúmina de huevo

25 Crecimiento vegetativo - reverso de color tostado ama-
rillento bordeado de marrón;

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

Pigmento soluble - tostado amarillento pálido.

Agar glicerol-asparagina

30 Crecimiento vegetativo - reverso marrón;

- 1 Micelio aéreo - aterciopelado, gris pálido con tono amarillento (2 dc);
Pigmento soluble - tostado pálido.
Agar sales inorgánicas - almidón (medio ISP 4)
- 5 Crecimiento vegetativo - reverso tostado amarillento verdoso;
Micelio aéreo - aterciopelado, gris medio con tono amarillento (3 fe);
Pigmento soluble - tostado muy pálido.
- 10 Agar extracto de levadura-dextrosa + sales
Crecimiento vegetativo - reverso marrón oscuro;
Micelio aéreo - gris oscuro mezclado con un gris más claro;
Pigmento soluble - ninguno
- 15 Agar extracto de levadura - extracto de malta (medio ISP 2)
Crecimiento vegetativo - reverso marrón;
Micelio aéreo - aterciopelado, gris oscuro bordeado de gris más claro;
Pigmento soluble - ninguno
- 20 Agar leche descremada
Crecimiento vegetativo - tostado;
Micelio aéreo - escaso, blanquecino;
Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio;
Hidrólisis de la caseína - buena.
- 25 Leche de tornasol
Crecimiento vegetativo - anillo de crecimiento moderado, tostado;
Micelio aéreo - ninguno;
Color - púrpura;
- 30 Coagulación y/o peptonización - peptonización completa,

1

volviéndose alcalina

Leche descremada

Crecimiento vegetativo - anillo de crecimiento moderado,
tostado;

5

Micelio aéreo - ninguno;

Pigmento soluble - marrón pálido;

Coagulación y/o peptonización - peptonización completa,
volviéndose alcalina

Agar tirosina nutriente

10

Crecimiento vegetativo - reverso marrón oscuro;

Micelio aéreo - gris oscuro bordeado de blanco grisáceo;

Pigmento soluble - ligero pardeamiento del medio;

Descomposición de la tirosina - positiva.

Agar peptona-hierro-extracto de levadura

15

Crecimiento vegetativo - tostado;

Micelio aéreo - blanquecino, moderado;

Pigmento soluble - ninguno;

Melanina - ninguna;

Producción de H₂S - negativa

20

Agar nutriente

Crecimiento vegetativo - reverso marrón grisáceo pálido;

Micelio aéreo - gris pálido bordeado de gris oscuro;

Pigmento soluble - ninguno

25

Agar almidón nutriente

Crecimiento vegetativo - tostado bordeado de gris;

Micelio aéreo - gris medio;

Pigmento soluble - ninguno;

Hidrólisis del almidón - buena

30

Agar gelatina nutriente

Crecimiento vegetativo - tostado bordeado de gris;

- 1 Micelio aéreo - blanco grisáceo;
 Pigmento soluble - ninguno;
 Licuefacción de la gelatina - buena
- Trozo de patata
- 5 Crecimiento vegetativo - tostado;
 Micelio aéreo - gris medio a oscuro;
 Pigmento soluble - ninguno
- Suero sanguíneo de Loeffler
- Crecimiento vegetativo - de color crema;
- 10 Micelio aéreo - ninguno;
 Pigmento soluble - ninguno;
 Licuefacción - nula

- Planchas de gelatina
- Crecimiento vegetativo - tostado;
- 15 Micelio aéreo - ninguno;
 Pigmento soluble - ninguno;
 Licuefacción de la gelatina - completa.

20 Todas las lecturas indicadas 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. Las designaciones de color utilizadas en la descripción están de acuerdo con las definiciones del Color Harmony Manual, cuarta edición (1958), Container Corporation of América, Chicago, Illinois.

25 También se determinó la capacidad del Streptomyces flavogriseus MA-4638 para utilizar o asimilar diversos hidratos de carbono. Para este fin, se cultivó el microorganismo sobre medio sintético basal (Pridham and Gottlieb) conteniendo un 1 % de hidrato de carbono, a 28°C durante 3 semanas.

30

1 El pH de los medios empleados en el estudio era aproximada-
mente neutro (6,8-7,2). La Tabla I muestra la utilización
de estas fuentes de hidratos de carbono por el Streptomyces
5 flavogriseus MA-4638; el signo + indica crecimiento, + cre-
cimiento pobre o cuestionable y - crecimiento nulo en compa-
ración con un control negativo (sin fuente de carbono).

TABLA I

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

15 El grado de crecimiento con las variaciones de tem-
peratura y los requisitos de oxígeno del microorganismo son
los siguientes:

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

20 28°C - buen crecimiento vegetativo y aéreo

37°C - buen crecimiento vegetativo; no hay hifas aéreas

50°C - crecimiento nulo

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

25 Aerobio.

Esta invención no se limita al organismo Streptomyces
flavogriseus ni a organismos que respondan totalmente a las
características de crecimiento y microscópicas antes citadas,
que se dan con fines ilustrativos. Se desea y pretende incluir
30 el uso de mutantes producidos a partir del organismo descrito

1 por diversos medios, como radiación X, radiación ultravioleta, mostaza nitrogenada, exposición a fagos y similares.

5 El compuesto 890A₁₀ es producido durante la fermentación aerobia en condiciones controladas de medios nutritivos acuosos adecuados, inoculados con una cepa del organismo Streptomyces flavogriseus. Son adecuados para la producción de 890A₁₀ los medios acuosos como los empleados para la producción de otros antibióticos. Estos medios contienen fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas asimilables por el microorganismo.

10 En general, como fuentes de carbono asimilable en el medio nutritivo pueden utilizarse hidratos de carbono como azúcares, por ejemplo dextrosa, glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, xilosa, manitol y similares y almidones como dextrina o como granos, por ejemplo avena, centeno, almidón de maíz, harina de maíz y similares, solos o en combinación. La cantidad de hidratos de carbono habitualmente varía entre 1 y 6 % del peso del medio, aproximadamente. Estas fuentes de carbono pueden utilizarse individualmente o pueden combinarse en el medio varias de estas fuentes de carbono.

15 En general, como fuentes de nitrógeno pueden utilizarse muchos materiales proteicos en el proceso de fermentación. Las fuentes de nitrógeno adecuadas son, por ejemplo, hidrolizados de levadura, levadura primaria, harina de soja, harina de algodón, hidrolizados de caseína, licor de infusión de maíz, solubles de destilería y similares, siendo la fuente preferida los solubles de destilería. Las fuentes de nitrógeno, solas o en combinación, se utilizan en proporciones que oscilan aproximadamente entre 0,2 y 6 % del peso del medio acuoso.

20

25

30

1 Entre las sales inorgánicas nutritivas que pueden
incorporarse a los medios de cultivo se encuentran las sa-
les habituales capaces de formar iones sodio, potasio, amo-
nio, calcio, magnesio, fosfato, sulfato, cloruro, carbona-
5 to y similares. También están incluidos los metales traza
como cobalto, manganeso y hierro.

 Los medios descritos en los ejemplos son simplemen-
te ilustrativos de la amplia variedad de medios que pueden
emplearse y no se pretende que sean limitativos.

10 La fermentación se realiza a temperaturas compren-
didas aproximadamente entre 20 y 37°C; sin embargo, para
obtener resultados óptimos es preferible efectuar la fermen-
tación a temperaturas de unos 23 a 28°C. El pH inicial de
los medios nutritivos adecuado para cultivar cepas del cul-
15 tivo Streptomyces flavogriseus y producir el antibiótico
890A₁₀ puede variar entre 6,0 y 8,0 aproximadamente.

 Aunque el antibiótico 890A₁₀ es producido en culti-
vos superficiales y sumergidos, se prefiere efectuar la fer-
mentación en estado sumergido.

20 Convenientemente se realiza la fermentación a peque-
ña escala del antibiótico inoculando un medio nutritivo ade-
cuado con el cultivo productor de antibiótico y, después de
transferir a un medio de producción, permitiendo que transcu-
rra la fermentación a una temperatura constante de unos 24°C
25 en un sacudidor, durante varios días.

 La fermentación se inicia en un matraz esterilizado
de medio nutritivo a través de una o más etapas de desarro-
llo de siembra. El medio nutritivo para la fase de siembra
puede ser cualquier combinación adecuada de fuentes de carbo-
30 no y de nitrógeno. El matraz de siembra se sacude en una cá-

1 para a una temperatura constante de unos 28°C durante 1 día,
o hasta que el crecimiento es satisfactorio, y parte del cul-
tivo resultante se utiliza para inocular un medio de siembra
de segunda fase o el medio de producción. Los matraces de
5 siembra de fases intermedias, cuando se usan, se desarrollan
esencialmente de la misma forma; es decir, parte del conteni-
do del matraz de la última fase de siembra se utiliza para
inocular el medio de producción. Los matraces inoculados se
sacuden a temperatura constante durante varios días y al fi-
10 nal del periodo de incubación el contenido del matraz se cen-
trifuga o se filtra.

 Para el trabajo a gran escala, es preferible efectuar
la fermentación en tanques adecuados provistos de un agitador
y de medios de aireación del medio de fermentación. De acuer-
15 do con este método, el medio nutritivo se prepara en el tanque
y se esteriliza calentando a temperaturas de hasta 120°C apro-
ximadamente. Después de enfriar se inocula el medio esteri-
lizado con una siembra previamente cultivada del cultivo pro-
ductor y se permite que transcurra la fermentación durante
20 un periodo de tiempo como, por ejemplo, de 1 a 6 días mien-
tras se agita y/o airea el medio nutritivo y se mantiene la
temperatura alrededor de 22 a 26°C. Este método de producción
del antibiótico 890A₁₀ es especialmente adecuado para la pre-
paración de grandes cantidades del antibiótico.

25 Propiedades físicas y químicas del antibiótico 890A₁₀

 El antibiótico 890A₁₀ es una sustancia ácida que mi-
gra 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
30 frente a un recorrido de 4,0 cm para el 890A₁. La sal disódica

1 es un polvo blanco o ligeramente amarillo cuando se obtiene por liofilización de una solución acuosa. En condiciones ácidas en solución acuosa el antibiótico es inestable y no se ha aislado la forma ácida libre.

5 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. La E % a 300 nm del preparado más purificado de la sal disódica es 214. La relación A_{300}/A_{250} es 3,33 para la muestra más purificada y la relación A_{300}/A_{220} es 2,05. La evidencia de ligeras impurezas en esta muestra sugiere que las relaciones correspondientes para una muestra de pureza definitiva serán algo mayores. Más del 94 % de la absorción a 300 nm puede ser extinguida por reacción con hidroxilamina a pH neutro. La absorbancia a 250 nm también
10 disminuye por reacción con hidroxilamina y la relación entre la disminución de absorbancia a 250 nm y la disminución a 300 nm es aproximadamente 0,16. La reacción con hidroxilamina, seguida por disminución de la A_{300} en las condiciones descritas en la sección titulada "Reacción con Hidroxilamina" es aparentemente de primer orden, con un periodo de semi-reacción a la temperatura ambiente de 23 a 60 segundos.

15 Cuando se mide frente a un patrón de antibiótico 890A₁, el antibiótico 890A₁₀ contiene 174 unidades de bioanálisis por unidad HAEA₃₀₀. La unidad HAEA₃₀₀ está descrita
20 bajo la sección titulada "Reacción con Hidroxilamina".

25 La Tabla II contiene una lista de las señales del espectro de resonancia magnética nuclear a 100 MHz del antibiótico 890A₁₀ en D₂O a 32°C. Los desplazamientos químicos se dan en ppm con respecto al HOD a 4,70δ a 32°C y las constantes de acoplamiento se dan hertzios.
30

1

TABLA II

5

10

CH ₃ CH	1,55 (3H, d, 6,5 Hz)
CH ₃ CO	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	~ 4,34 (1H, d, t; J ₅₋₆ = 5,5 Hz; J ₅₋₁ = 9,5 Hz)
C ₍₈₎ -H	~ 4,8 (parcialmente cubierto por la línea HOD)
C ₍₁₎ -H ₂	~ 3,14 (1H, d, d; ~ 9,2 + ~ 18 Hz) ~ 3,33 (1H, d, d; ~ 10 + 18 Hz)
-CH ₂ NH	3,43 (2H, t, 7 Hz)
-CH ₂ -S-	3,03 (2H, m).

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

TABLA III

15

20

m/e	86
	227,0224 C ₅ H ₁₅ SO ₄ Si ₂ , calculado: 227,0230
	241
	300/1
	339,1325 C ₁₅ H ₂₅ NO ₄ Si ₂ , calculado: 339,1322
	342,1444 C ₁₅ H ₂₆ N ₂ O ₃ SSi, calculado: 342,1433
	368
	440
	458.

Propiedades físicas y químicas del desacetil-890A₁₀

25

La Tabla IV contiene una lista del perfil del espectro antibacteriano del desacetil-890A₁₀.

30

TABLA IV

ASP# Organismo, MB# (ATCC#)	Diámetro de la zona de inhibición, mm
1 <u>Bacillus</u> esp. 633	28
2 <u>Proteus vulgaris</u> 1012	5
3 <u>Pseudomonas aeruginosa</u> 979	0

1

TABLA IV (continuación)

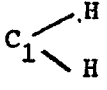
	<u>ASP# Organismo, MB# (ATCC#)</u>	<u>Diámetro de la zona de inhibición, mm</u>
	4 <u>Serratia marcescens</u> 252 (990)	9
5	5 <u>Staphylococcus aureus</u> 108 (6538 P)	23
	6 <u>Bacillus subtilis</u> 964 (6633)	31
	7 <u>Sarcina lutea</u> 1101	21
	8 <u>Staphylococcus aureus</u> 698	20
	9 <u>Streptococcus faecalis</u> 753	0
10	10 <u>Brucella bronchiseptica</u> 965 (4617)	0
	11 <u>Vibrio percolans</u> 1272 (8461)	27
	12 <u>Proteus vulgaris</u> 838 (21100)	14
	13 <u>Escherichia coli</u> 1418	12
	14 <u>Pseudomonas stutzeri</u> 1231 (11607)	16
15	15 <u>Klebsiella pneumoniae</u> 1264	8
	16 <u>Aerobacter aerogenes</u> 835	9
	17 <u>Erwinia atroseptica</u> 1159 (4446)	11
	18 <u>Pseudomonas aeruginosa</u> 2824	14H
	19 <u>Corynebacterium pseudodiph</u> 261 (9742)	14
20	20 <u>Escherichia coli</u> 60 (9637)	10
	21 <u>Streptococcus faecium</u> 2820	0
	22 <u>Streptococcus agalactiae</u> 2875	23
	23 <u>Proteus vulgaris</u> 2112 (episome)	15
	24 <u>Proteus mirabilis</u> 3126	0
25	25 <u>Vibrio percolans</u> 1272 + 2 x 10 ⁵ u/ml de penicilinasa	10
	26 <u>V. percolans</u> 1272 + lactamasa de <u>Enterobacter</u> MB 2646	28
	27 <u>Micrococcus flavus</u> 369 (10240)	17

30

La Tabla V contiene las señales del espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) a 300 MHz del 890A₁₀ desace-

1 tilado, determinadas con respecto al patrón interno DSS (2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato sódico) en D₂O (24°C).

TABLA V

	H	δ^a
5	CH ₃	1,51 (6,2) ^b
	CH ₂ S	3,14
	CH ₂ N	3,43
		3,07 (18,0, 8,5)
10		3,43 (18,0, 9,0)
	H ₆	3,88 (5,6, 8,9)
	H ₅	4,36
	H ₈	4,7-4,9 (estimado)

15 ^a desplazamientos relativos a la posición calculada del DSS interno

^b los valores entre paréntesis son las constantes de acoplamiento.

20 La movilidad del 890A₁₀ desacetilado se determina en Dowex-1. Se aplican aproximadamente 100 µg de desacetil-890A₁₀ a una columna (0,7 x 15 cm) de Dowex-1 x 2 (Cl⁻), 200-400 mallas, a una fuerza iónica inferior a 0,01M y se eluye con una solución que contiene NaCl 0,10M + NH₄Cl 0,011M + NH₃ 0,0001M a pH 7,2 en agua desionizada. El pico principal de desacetil-890A₁₀ aparece entre unos volúmenes eluidos de 65 ml y 124 ml, con un máximo a un volumen eluido de 109 ml.

25 El desacetil-890A₁₀ presenta una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 296 nm.

30 La movilidad del desacetil-890A₁₀ se determina so-

1

bre cromatografía en capa fina y por electroforesis.

5

Por cromatografía en capa fina del desacetil-890A₁₀ sobre láminas de celulosa Eastman Chromagram 6064 a 23°C, en etanol al 66 % en volumen, el antibiótico presenta una R_f de 0,68, medida por bioautografía.

10

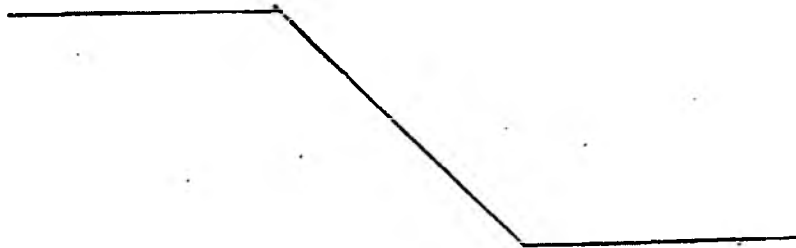
Por electroforesis de desacetil-890A₁₀ en papel cromatográfico Whatman 3MM, utilizando un tampón que contiene 35,2 g de KH₂PO₄ + 57,2 g de Na₂HPO₄ por litro, a 47 voltios/cm durante 50 minutos, el antibiótico desacetil-890A₁₀ se mueve 65 mm hacia el electrodo positivo. En las mismas condiciones, el antibiótico 890A₁₀ se mueve 118 mm hacia el electrodo positivo. Las movilidades se miden por bioautografía, empleando cloranfenicol como marcador de referencia, cuya movilidad se supone que es cero.

15

20

25

30



1 El desacetil-890A₁₀, que es el compuesto de esta
invención, es un valioso antibiótico activo contra diversas
bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y, por consiguien-
te, encuentra aplicación en medicina y veterinaria. El com-
5 puesto de esta invención puede utilizarse como droga antibac-
teriana para el tratamiento de las infecciones causadas por
bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, por ejemplo con-
tra cepas susceptibles de Staphylococcus aureus, Proteus
mirabilis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Entero-
10 bacter cloacae y Pseudomonas aeruginosa. El material antibac-
teriano de la invención puede ser utilizado además como adi-
tivo para los piensos de animales, en la preservación de ali-
mentos y como desinfectante. Por ejemplo, puede emplearse
en composiciones acuosas a concentraciones que oscilan entre
15 0,1 y 100 partes de antibiótico por millón de partes de so-
lución o preferiblemente a concentraciones que oscilan apro-
ximadamente entre 1 y 10 partes de antibiótico por millón
de partes de solución, con objeto de destruir e inhibir el
crecimiento de las bacterias perjudiciales sobre el equipo
20 dental y médico y como bactericidas en aplicaciones industria-
les, por ejemplo en las pinturas al agua y en el agua blanca
de las papeleras para inhibir el crecimiento de las bacterias
perjudiciales.

25 El antibiótico de esta invención puede utilizarse en
cualquiera de los diversos preparados farmacéuticos como úni-
co ingrediente activo o en combinación con uno o más antibió-
ticos o con una o más sustancias farmacológicamente activas.
Como ejemplo de las primeras, puede coadministrarse un anti-
biótico de aminociclitol, como la gentamicina, para reducir
30 al mínimo cualquier oportunidad de emergencia de organismo

1 resistente. Como ejemplo de las últimas, pueden combinarse
difenoxilato y atropina en dosis destinadas a la terapia
de la gastroenteritis. El antibiótico puede emplearse en
5 forma de cápsulas o como tabletas, polvos o soluciones líquidas
o como suspensiones o elixires. Puede administrarse por
vía oral, tópica, intravenosa o intramuscular.

Las tabletas y cápsulas para administración oral
pueden encontrarse en forma de dosis unitaria y pueden con-
tener excipientes convencionales como agentes ligantes, por
10 ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto
o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar,
almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubri-
cantes, por ejemplo estearato magnésico, talco, polietilen-
glicol y sílice; desintegrantes, por ejemplo almidón de pa-
15 tata o agentes humectantes aceptables como laurilsulfato
sódico. Las tabletas pueden ser recubiertas por métodos co-
nocidos en este campo. Los preparados líquidos orales pueden
adoptar la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones
acuosas u oleosas, jarabes, elixires, etc o pueden presentar
20 se en forma de producto seco para su reconstitución con agua
o con otros vehículos adecuados antes de su uso. Estos pre-
parados líquidos pueden contener aditivos convencionales co-
mo agentes suspensores, por ejemplo jarabe de sorbitol, meti-
celulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilce-
25 lulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o
grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por
ejemplo lecitina, monooleato de sorbitano o goma arábiga;
vehículos no acuosos que pueden incluir aceites comestibles,
por ejemplo aceite de almendras, aceite de coco fraccionado,
30 ésteres oleosos, propilenglicol o alcohol etílico; preserva-

1 tivos, por ejemplo p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o
ácido sórbico. Los supositorios contienen las bases conven-
5 cionales para supositorios, v.g. manteca de cacao u otro gli-
cérido.

5 Las composiciones para inyección pueden presentarse
en dosis unitarias en ampollas o en envases de dosis múlti-
10 ples con un preservativo añadido. Las composiciones pueden
adoptar formas como suspensiones, soluciones, emulsiones en
vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de for-
mulación como agentes suspensores, estabilizantes y/o dis-
persantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede en-
contrarse en forma de polvo para su reconstitución con un
vehículo adecuado, v.g. agua estéril exenta de pirógenos,
antes de su uso.

15 Las composiciones también pueden prepararse en formas
adecuadas para su absorción a través de las membranas mucó-
sas de la nariz y de la garganta o de los tejidos bronquia-
les y pueden convenientemente adoptar la forma de atomizacio-
20 nes en polvo o líquidas o inhalaciones, trochas, pinturas
de la garganta, etc. Para la medicación de los ojos u oídos,
los preparados pueden presentarse como cápsulas individuales,
en forma líquida o semisólida o pueden utilizarse en forma de
gotas, etc. Las aplicaciones tópicas pueden formularse en
25 bases hidrófobas o hidrófilas como ungüentos, cremas, locio-
nes, pinturas, polvos, etc.

30 Asimismo, además de un vehículo, estas composicio-
nes pueden contener otros ingredientes como estabilizantes,
ligantes, antioxidantes, preservativos, lubricantes, agentes
suspensores, agentes modificadores de la viscosidad, agentes
aromatizantes y similares.

1 En veterinaria, por ejemplo en el tratamiento de pollos, vacas, corderos, cerdos y similares, las composiciones pueden ser formuladas, por ejemplo, como preparados intramamarios en bases de acción retardada o de liberación rápida.

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

10 En el tratamiento de las infecciones bacterianas en el hombre, el compuesto de esta invención se administra por vía oral o parenteral, de acuerdo con los procedimientos convencionales para la administración de antibióticos, en una proporción de alrededor de 2 a 600 mg/kg/día y preferiblemente alrededor de 5 a 100 mg/kg/día, preferiblemente en dosis fraccionadas, por ejemplo 3 a 4 veces al día. Puede administrarse en dosis unitarias que contienen, por ejemplo, 25, 250, 330, 400 o 1000 mg de ingrediente activo con vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables adecuados.

15 Las dosis unitarias se encuentran en forma de preparados líquidos como soluciones o suspensiones o en forma sólida como tabletas o cápsulas. Naturalmente, se sobreentiende que la dosis óptima en cualquier caso dado dependerá del tipo y gravedad de la infección en tratamiento y que se emplearán dosis menores para uso en pediatría, estando todos estos ajustes al alcance del médico.

20 PROCEDIMIENTOS DE ANALISIS DEL ANTIBIOTICO 890A₁₀

25 I. Bioanálisis

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

1 agar empleando Vibrio percolans ATCC 8461 como organismo de
ensayo. Como patrón se utiliza una muestra purificada del
antibiótico 890A₁. Este último se prepara por el procedimien
to descrito en el Ejemplo 4.

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

Se suspende un cultivo liofilizado de Vibrio perco-
lans ATCC 8461 en 15 ml de un medio esterilizado que contie-
ne 8 g/litro de caldo nutritivo Difco y 2 g/litro de extrac-
to de levadura en agua destilada, " nutrient broth-yeast
10 extract" (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 tu-
bos inclinados que contienen 1,5 % de agar en NBYE y los tu-
bos inoculados se incuban durante la noche a 28°C y después
15 se mantienen en un frigorífico.

Los tubos inclinados refrigerados, preparados a par-
tir de un solo cultivo liofilizado, se utilizan durante has-
ta 4 semanas a partir del momento de su preparación, como
20 sigue: se dispersan 4 ml de inoculum del tubo inclinado en
50 ml de NBYE contenidos en un erlenmeyer de 250 ml. El cul-
tivo se incuba durante la noche en un sacudidor rotatorio a
28°C y después se diluye hasta una densidad que produzca una
transmitancia del 50 % a 660 nm. Se agregan 33,2 ml de este
25 cultivo diluido a 1 litro de NBYE conteniendo 15 g de agar
y mantenido a 46°C. El medio conteniendo agar inoculado se
vierte en placas Petri de plástico de 100 x 15 mm, a razón
de 5 ml por placa, se enfría y se mantiene a 2-4°C durante
hasta 5 días antes de su uso.

30 Se sumergen unos discos de papel de filtro de media

1 pulgada (12,7 mm) de diámetro en la solución a analizar y
se colocan sobre el agar. Alternativamente, los discos pueden
5 cargarse pipeteando 0,1 ml de solución sobre cada disco seco
y después colocando el disco sobre el agar. El diámetro de
la zona de inhibición se mide después de una incubación apro-
piada (12-24 horas a 25°C). Si es necesario, se preparan di-
luciones de las soluciones a analizar en tampón de fosfato
potásico 0,05M, pH 7,4, "potassium phosphate buffer" (deno-
minado en lo que sigue KPB) o en agua desionizada.

10 El cálculo de las potencias se realiza como sigue:
se determina una pendiente midiendo los diámetros de zona
de una solución del antibiótico 890A₁₀ y de una dilución
de cuatro veces (en KPB) de esta solución. Se analizan dos
discos de cada concentración sobre una sola placa y se deter-
15 mina el tamaño medio de zona para cada concentración. La
pendiente es igual a la mitad de la diferencia entre los ta-
maños medios de zona. Después se calculan las potencias me-
diante la siguiente fórmula:

20
$$\text{Potencia (unidades/ml)} = (\text{Potencia del patrón}) \times \text{Dilución} \times 10^{\left(\frac{(D - D_s) \log 2}{\text{pendiente}} \right)}$$

donde D es el diámetro medio de las zonas formadas por la
incógnica, D_s es el diámetro medio de las zonas patrón y
"Dilución" es el grado al cual se diluye la incógnica antes
25 del ensayo. Si no se utiliza ningún patrón, se supone que
D_s es 25 mm y se toma la (Potencia del Patrón) como una uni-
dad/ml cuando se mide sobre Vibrio percolans ATCC 8461. Se
define el antibiótico 890A₁ como un antibiótico con una po-
tencia de 250 unidades por unidad de absorbancia extingui-
ble por hidroxilamina a 300 nm, cuando se utiliza como patrón.

1 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 cefaloridina. Las placas conteniendo Vibrio percolans ATCC 8461 se preparan como sigue. Se incuba un cultivo de Vibrio percolans ATCC 8461 en caldo nutritivo-extracto de levadura durante la noche, en un sacudidor rotatorio a 28°C y después se diluye hasta 10 una densidad del 60 % de transmitancia a 660 nm. Se agregan 33,2 ml de este cultivo diluido a 1 litro de un medio constituido por agar nutriente más 0,2 % de extracto de levadura, mantenido a 46°C. El medio conteniendo agar inoculado se vierte en placas Petri de plástico de 100 x 15 mm, a razón de 15 10 ml por placa, se enfría y se mantiene a 2-4°C durante hasta 5 días antes de su uso.

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

25

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

30 Una unidad se define como la cantidad de antibiótico

1 por mililitro que produce una zona de inhibición de 25 mm en
una placa de 5 ml como se ha descrito en la sección I ante-
rior. Por lo tanto, en este análisis, una concentración de
5 12,5 mcg/ml de cefaloridina se considera equivalente a una
unidad de 890A₁ por mililitro. Como la pendiente de la línea
de la cefaloridina es 4,0, los cálculos de la potencia de
una muestra se realizan utilizando una pendiente de 4,0.

III. Reacción con hidroxilamina

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

15 La solución a analizar se lleva a 0,05M en fosfato
potásico, pH 7,4, por adición de 1/20 volúmenes de una solu-
ción que contiene K₂HPO₄ 0,8M y KH₂PO₄ 0,2M. Después se aña-
den 1/100 volúmenes de hidrocloreuro de hidroxilamina 1M y
se mide la absorbancia a 300 nm a intervalos de 0,5 a 2 mi-
nutos. La reacción se lleva a cabo a la temperatura ambiente.
Se supone una cinética de primer orden y el periodo de semi-
20 reacción se estima a partir de la disminución de absorbancia
durante los 10 primeros minutos. A partir de este periodo de
semi-reacción se estima el tiempo transcurrido el cual ya no
debe observarse ninguna nueva reducción de la absorbancia y
se prosiguen las observaciones más allá de este tiempo. Si
25 no se observa ninguna reducción de la absorbancia una vez pa-
sado este tiempo, se toma la disminución total de absorbancia
(corregido el efecto de dilución y la absorbancia de la hi-
droxilamina) como la "Absorbancia extingüible por hidroxil-
amina a 300 nm (HAEA₃₀₀)". Si se observa una disminución de
30 la absorbancia más allá de este tiempo, se calcula el ritmo

1 de disminución de la absorbancia de fondo y la disminución
observada en ese momento se corrige teniendo en cuenta la
disminución de fondo, suponiendo que ésta es lineal con el
tiempo. Entonces se registra el valor corregido como la
5 HAEA₃₀₀.

El número de unidades HAEA₃₀₀ es igual a HAEA₃₀₀ mul-
tiplicado por el volumen en mililitros.

10 Los ejemplos que siguen ilustran los métodos de obten-
ción de los productos de esta invención. Sin embargo, los
ejemplos son solamente ilustrativos y resulta evidente al
que posea un conocimiento normal de este campo que esta in-
vención incluye los productos funcionalmente equivalentes
y los métodos para su preparación. Por lo tanto, cualquier
15 modificación de los procedimientos aquí descritos que den lu-
gar a la formación de los productos de esta invención, debe
considerarse como constitutiva de un método análogo. Los pro-
cedimientos descritos son susceptibles de amplias variacio-
nes y modificaciones y cualquier pequeña desviación o amplia-
ción se considera dentro del alcance del experto en este cam-
20 po y dentro de los límites de esta invención.

EJEMPLO 1

Método de aislamiento de los organismos productores de N-ace-
til-890A₁₀-amidohidrolasa

25 Se prepara una suspensión al 1 % en peso/volumen de
una tierra arcillosa fértil suspendiendo 1 g de tierra de
pradera en 100 ml de tampón de fosfato-solución salina esté-
ril, donde el tampón de fosfato-solución salina tiene la si-
guiente composición:

30

1

Tampón de fosfato-solución salina

NaCl 8,8 g

Tampón de fosfato 1M,
pH 7,5* 10 ml

5

Agua destilada 1000 ml

* Tampón de fosfato 1M, pH 7,5

Se mezclan 16 ml de KH_2PO_4 1M con 84 ml de K_2HPO_4 1M. El pH del tampón de fosfato se ajusta a 7,5 por adición de pequeñas cantidades de KH_2PO_4 1M o K_2HPO_4 1M.

10

Se emplean partes alícuotas de esta suspensión de tierra de reserva al 1 % para preparar diluciones 10x, 100x y 1000x.

15

Se añaden partes alícuotas de 1 ml de la suspensión de reserva o partes alícuotas de 1 ml de las diluciones 10x, 100x y 1000x a partes alícuotas de 2 ml de soluciones estériles de agar al 1,0 % a 48°C. Las mezclas se vierten rápidamente sobre la superficie de placas Petri estériles de 85 mm de diámetro conteniendo 20 ml de Medio A. El Medio A tiene la siguiente composición:

20

Medio A

KH_2PO_4 3,0 g

K_2HPO_4 7,0 g

MgSO_4 0,1 g

Agua destilada 1000 ml

25

Solución de N-acetil
etanolamina* 8,5 ml

* Solución de N-acetiletanolamina

La N-acetiletanolamina se diluye 10 veces en agua y se esteriliza con membrana. Esta solución se agrega después de tratar en autoclave.

30

Para medios sólidos: Añadir 20 g de agar.

1 Las placas Petri se incuban durante 18 días a 28°C.
Las colonias bien aisladas se recogen y se depositan en lis-
tas sobre el Medio B. El Medio B tiene la siguiente compo-
sición:

5

Medio B

Pasta de tomate . 40 g
Harina de avena molida 15 g
Agua destilada 1000 ml
pH ajustado a 6 con NaOH.

10

Para medios sólidos: Agregar 20 g de agar.

Se seleccionan cepas individuales y se cultivan du-
rante 2 días a 28°C sobre tubos inclinados de Medio B.

15

Se emplea 1 parte del cultivo de los tubos inclina-
dos para inocular un erlenmeyer de 250 ml que contiene 50 ml
de Medio A; un erlenmeyer de 250 ml que contiene 50 ml de
Medio B suplementado (suplementado después de tratamiento en
autoclave con 0,4 ml de una solución esterilizada en membra-
na de N-acetiletanolamina diluída 10 veces con agua) y un
erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de Medio C. El Medio
C tiene la siguiente composición:

20

Medio C

Dextrosa 20 g
Pharmamedia 8 g
Licor de infusión de maíz
(en mojado) 5 g
Agua destilada 1000 ml
pH ajustado a 7 con NaOH o HCl
Solución de N-acetileta-
nolamina* 8,5 ml

25

* Solución de N-acetiletanolamina

30

Se diluye la N-acetiletanolamina 10 veces en agua y

1 se esteriliza en membrana. Esta solución se agrega después
de tratar en autoclave.

5 Los matraces se sacuden a 28°C en un sacudidor a
220 rpm (diámetro de la órbita circular 2", 5 cm) durante
4 días. Se centrifugan partes alícuotas de 30 ml de cada ma-
traz durante 15 minutos a 8000 rpm. Se retira la porción que
sobrenada, dejando solamente suficiente para formar una sus-
pensión espesa de células y medio sólido. La mitad de la so-
lución se somete a disrupción ultrasónica empleando un so-
nificador Branson Instrument Model LS-75 con una probeta de
10 0,5" (12,7 mm). La potencia de entrada se coloca en la posi-
ción n° 4 y se utilizan cuatro ciclos sucesivos de irradia-
ción de 15 segundos mientras se enfría la suspensión en agua
de hielo durante la disrupción y entre disrupciones sucesivas.
15 Para determinar la presencia de actividad de N-acetil-890A₁₀-
amidohidrolasa se mezclan 10 µl del sonicado con 25 µl de
una solución de 890A₁₀ que contiene 500 µg/ml. Los contro-
les contienen antibiótico y tampón solamente y también se
utilizan en cada operación células sonicadas y tampón sin
20 antibiótico. Después de incubar durante la noche a 28°C, se
aplican partes alícuotas de 10 µl sobre papel Schleicher and
Schuell n° 2043-B. Utilizando tampón de fosfato potásico
0,03M a pH 7,1, se aplica un gradiente de voltaje de 50 vol-
tios/cm durante 30 minutos. El papel se coloca sobre una plá-
25 ca de Staphylococcus aureus ATCC 6538P y se incuba a 37°C
durante 18 horas.

30 Las placas de ensayo se preparan como sigue: Un cul-
tivo de una noche del organismo de ensayo, Staphylococcus
aureus ATCC 6538P, en caldo nutritivo más 0,2 % de extracto
de levadura se diluye con caldo nutritivo más 0,2 % de ex-

1 tracto de levadura para formar una suspensión con una trans-
mitancia de 60 % a una longitud de onda de 660 nm. Esta sus-
pensión se agrega sobre agar nutriente Difco suplementado
5 con 2,0 g/l de extracto de levadura Difco a 47-48°C para pre-
parar una composición que contiene 33,2 ml de la suspensión
por litro de agar. Se vierten 40 ml de esta suspensión en
placas Petri de 22,5 x 22,5 cm y estas placas se enfrían y
mantienen a 4°C hasta que se usan (5 días como máximo).

La mancha inalterada de 890A₁₀ bioactivo migra 8 cm
10 hacia el polo positivo. Se detecta una nueva mancha bioacti-
va debida al desacetil-890A₁₀ que migra 4 cm hacia el polo
positivo. Las mezclas de incubación de control de antibiótico
más tampón y de sonicado celular más tampón no producen nin-
gún material bioactivo que migre 4 cm hacia el polo positivo.

15

EJEMPLO 2

Desacetilación del 890A₁₀

Se utiliza 1 parte del cultivo de un tubo inclinado
de Protaminobacter ruber MB-3528 para inocular un erlenme-
20 yer de 250 ml que contiene 50 ml de Medio C. El Medio C tie-
ne la siguiente composición:

Medio C

Dextrosa	20 g
Pharmamedia	8 g
25 Licor de infusión de maíz (en mojado)	5 g
Agua destilada	1000 ml
pH ajustado a 7 con NaOH o HCl	
Solución de N-acetiletan- nolamina*	8,5 ml

30

* Solución de N-acetiletanolamina

Se diluye la N-acetiletanolamina 10 veces en agua y

1 se esteriliza en membrana. Esta solución se agrega después de tratarla en autoclave.

5 El matraz se sacude a 28°C en un sacudidor a 220 rpm (diámetro de la órbita circular 2", 5 cm), durante 4 días. Se centrifugan 25 ml procedentes del matraz durante 15 minutos a 8000 rpm. El líquido que sobrenada se separa y las células de la superficie del medio sólido se rascan sobre 0,5 ml de tampón de fosfato potásico 0,05M, pH 7,4. La suspensión resultante se somete a disrupción ultrasónica utilizando un sonificador Branson Instrument Model LS-75 con una probeta de 0,5" (12,7 mm), en la posición 4, durante cuatro intervalos de 15 segundos mientras se enfría la suspensión en agua de hielo durante la disrupción y entre disrupciones sucesivas. Se mezclan 10 µl del sonicado con 25 µl de una solución de 890A₁₀ que contiene 500 µg/ml. También se utilizan controles conteniendo antibiótico y tampón solo y células sonicadas y tampón sin antibiótico. Después de incubar durante la noche a 28°C, se aplican partes alícuotas de 10 µl sobre papel Schleicher & Schuell n° 2043-B. Empleando tampón de fosfato potásico 0,03M, pH 7,1, se aplica durante 30 minutos un gradiente de voltaje de 50 voltios/cm. El papel se coloca sobre una placa de ensayo de Staphylococcus aureus ATCC 6538P y se incuba a 37°C durante 18 horas.

15 20 25 30 Las placas de ensayo se preparan como sigue: Un cultivo de una noche del organismo de ensayo, Staphylococcus aureus ATCC 6538P, en caldo nutritivo más 0,2 % de extracto de levadura se diluye con caldo nutritivo más 0,2 % de extracto de levadura para formar una suspensión con una transmitancia del 60 % a una longitud de onda de 660 nm. Esta suspensión se agrega sobre agar nutriente Difco suplementado con

1 2,0 g/l de extracto de levadura Difco a 47-48°C para prepara-
rar una composición que contiene 33,2 ml de la suspensión
por litro de agar. Se vierten 40 ml de esta suspensión so-
bre plâcas Petri de 22,5 x 22,5 cm y estas placas se enfrían
5 y mantienen a 4°C hasta que se utilizan (5 días como máximo).

Además de la mancha bioactiva inalterada de 890A₁₀
que migra 8 cm hacia el polo positivo, se encuentra una nue-
va mancha bioactiva debida al desacetil-890A₁₀ que migra
4 cm hacia el polo positivo. Las mezclas de incubación de
10 control de antibiótico más tampón y de sonicado celular más
tampón no producen ningún material bioactivo que migre 4 cm
hacia el polo positivo.

EJEMPLO 3

Preparación del antibiótico 890A₁₀

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

Medio C

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

pH ajustado a 6,5 con NaOH antes de
esterilizar

* Ardamine: Yeast Products, Inc.

30 ** Solución tampón de fosfato:

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

5 Los matraces de siembra inoculados se sacuden durante 24-30 horas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ en un sacudidor giratorio a 210 rpm, diámetro de la órbita circular 2" (5 cm).

El cultivo de los matraces de siembra se utiliza para 10 inocular dos fermentadores de vidrio de 14 litros conteniendo 10 litros de medio de producción (Medio D más 0,15 % de aceite de soja en volumen).

Medio D

	Dextrina (almidón CPC modificado)	40,0 g
	Solubles de destilería	7,0 g
	Extracto de levadura	5,0 g
15	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50,0 mg
	Agua destilada	1000 ml

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

20 Los fermentadores operan a 24°C empleando una velocidad de agitación de 640 rpm (alrededor de 5,5 Kd) 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 %.

25 Se reúne el contenido de los dos fermentadores después de la fermentación, ascendiendo a unos 20 litros.

30 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 Super-Cel Hyflo en un embudo Lapp de 13" (33,5 cm) con un paño filtrante. El filtrado presenta una

1 bioactividad de 21 unidades/ml.

5 El caldo filtrado (18 litros) se aplica a una columna (8,2 x 29 cm) de Dowex-1x2(Cl⁻) de 50-100 mallas, a 150 ml/minuto. Después la columna se lava con 1 litro de agua desionizada seguido de 15 litros de NaCl 0,15N + tampón Tris-HCl 0,01M, pH 7,0 + EDTA neutra 25 μ M en MeOH al 50 %, a 150 ml/minuto.

10 Después se eluye el antibiótico 890A₁₀ con 3,2 % NaCl + tampón Tris-HCl 0,02M pH 7,0 + EDTA neutra 25 μ M en MeOH al 80 %, a 100 ml/minuto. Se recogen las siguientes fracciones: Una fracción de 1 litro, cuatro fracciones de 500 ml cada una y doce fracciones de 1 litro cada una. Se mide la bioactividad y la absorbancia a 220 nm en cada fracción y se combinan para purificarlas de nuevo las fracciones con unas relaciones de bioactividad/A₂₂₀ superiores a 0,6 unidades/unidad A₂₂₀ y que también contienen más del 10 % de la actividad recuperada total por fracción. Por lo tanto, se combinan las fracciones 4 a 8 que contienen en total el 22 % de la bioactividad aplicada.

20 Las fracciones reunidas se concentran a presión reducida hasta 190 ml, la sal precipitada se lava con agua desionizada y las aguas de lavado se agregan al líquido sobrenadante, 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 59 cm) de Amberlite XAD-2 que ha sido previamente lavada con 8 litros de acetona acuosa al 60 %, seguidos de 25 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 los antibióticos se eluyen con 30 agua desionizada a 35 ml/minuto. Se recogen las siguientes

1 fracciones: una fracción de 500 ml seguida de siete fracciones de 250 ml cada una y seguidas de cuatro fracciones de 500 ml.

5 Se miden los valores de la bioactividad y de la HAEA₃₀₄ sobre las fracciones 3 a 12. Las fracciones 4 a 9 presentan unas relaciones HAEA₃₀₄/A₂₂₀ superiores a 0,01 y se combinan para purificarlas de nuevo. También se agrega esta mezcla a la fracción 3, que contiene alrededor de 1/5 de la sal aplicada. La mezcla combinada contiene 469 unidades HAEA₃₀₄.

10 Las fracciones combinadas se diluyen hasta 4,1 litros y se aplican a una columna (2,15 x 42 cm) de Dowex-1x4(Cl⁻), -400 mallas, a 2 ml/minuto. La columna se lava con 100 ml de metanol al 50 % y el antibiótico se diluye con NaCl 0,25M + NH₄Cl 0,01M + NH₃ 0,0001M en MeOH al 80 %, a 2 ml/minuto aproximadamente. Se recogen fracciones desde 8 hasta 12 ml.

15 Se miden la bioactividad y la absorbancia a 220 nm, 260 nm y 300 nm para cada quinta fracción y la HAEA₃₀₀ sobre las fracciones de máxima bioactividad. La bioactividad 890A₁₀ aparece en las fracciones 85 a 150, con un máximo en la fracción 120. Las fracciones con unos valores de la relación HAEA₃₀₀/A₃₀₀ superiores a 0,05 se combinan para purificarlas de nuevo. Por lo tanto se combinan las fracciones 20 105 a 133 que contienen en total 130 unidades HAEA₃₀₀. Las fracciones 105 a 133 combinadas se diluyen hasta 1900 ml con agua desionizada y el pH se ajusta a 7,6. La muestra se aplica a una columna (2,15 x 42 cm) de Dowex-1x2(Cl⁻), 25 -400 mallas, que ha sido previamente lavada con 3 litros de NaCl al 3 % en metanol al 50 %, seguidos de 50 ml de metanol al 50 %. Cuando se ha aplicado toda la muestra, la co-

30

1 lumna se lava con 100 ml de metanol al 30 % y se eluye a
2 ml/minuto con NaCl 0,26M + NH₄Cl 0,005M + NH₃ 0,002M en
metanol al 30 %. Se recogen fracciones de 10 a 12 ml.

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

10 Las fracciones combinadas 240 a 275 se concentran a
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 de concentrado y aguas
18 de lavado se aplican a una columna (2,15 x 76 cm) de Bio-Gel
P-2 (200-400 mallas) que ha sido previamente lavada con 30
ml de agua desionizada saturada de NaCl, seguidos de 1500 ml
de agua desionizada y 50 ml de NH₃ 0,05mM en agua desioniza-
da. Una vez completada la aplicación, la columna se enjua-
20 ga 3 veces con 1 ml cada vez de NH₃ 0,05 mM en agua desio-
nizada y el antibiótico se eluye con NH₃ 0,05 mM en agua desio-
nizada a 0,73 ml/minuto. Se recogen fracciones de 3,65 ml ca-
da una.

25 El pico principal del antibiótico 890A₁₀ aparece en
las fracciones 29 a 50, con un máximo en la fracción 36. Las
fracciones con una relación A₃₀₀/A₂₅₀ superior a 1,9 y tam-
bién con una relación A₃₀₀/A₂₂₀ superior a 1,45 se combinan
para liofilizarlas y someterlas a análisis de RMN. Así, se
combinan las fracciones 36 a 45 que contienen 50,8 unidades
30 A₃₀₀ de las cuales 45,1 son extingüibles por hidroxilamina.

1 Las fracciones combinadas 36 a 45 se concentran a
presión reducida hasta 1 ml y se añaden 5 ml de D₂O. La mues-
tra se concentra de nuevo a 0,835 ml y 0,825 ml de éstos se
5 transfieren a un vial de vidrio y se liofilizan. La muestra
liofilizada contiene 48,2 unidades A₃₀₀ y 4,6 mg de sólidos.

EJEMPLO 4

Preparación del antibiótico 890A₁

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

Medio A

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

* Solución tampón de fosfato

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

25 Esta suspensión se emplea para inocular un erlenmeyer
de siembra de 250 ml, de triple tabique, que contiene 54 ml
del Medio B de siembra de la siguiente composición:

Medio B

30	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

1

pH ajustado a 6,5 con NaOH

* Ardamine: Yeast Products Corporation.

** Solución tampón de fosfato

5

KH_2PO_4 91,0 g

Na_2HPO_4 95,0 g

Agua destilada 1000 ml

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

10

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

Medio C

15

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

Agua destilada 1000 ml

20

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

Después de la inoculación, los matraces de producción se incuban a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ sacudiendo en un sacudidor giratorio a 220 rpm (diámetro de la órbita circular 2", 5 cm), durante 3 días. En los matraces se analiza la actividad frente a placas de ensayo patrón de Vibrio percolans ATCC 8461, empleando discos de ensayo de 0,5" (12,7 mm) sumergidos en 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:

30

Edad de la cosecha, horas 72

1 ionizada a un caudal de 6 ml/minuto, recogién dose fracciones de 40 a 260 ml.

5 La actividad antibiótica aparece en las fracciones 6 a 14, que se extienden desde 220 hasta 2560 ml de volumen eluído. El pico se encuentra en las fracciones 9 y 10, que se extienden desde 370 hasta 590 ml de volumen eluído. Se combinan para tratarlas de nuevo las fracciones 9 a 12, que se extienden desde 370 hasta 1060 ml de volumen eluído y presentan las máximas relaciones de HAEA₃₀₀/A₃₂₀. Estas fracciones contienen 36.600 unidades que equivalen al 126 % de la actividad aparente aplicada.

10 Las fracciones combinadas 9 a 12 se concentran hasta 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 de 2 ml/minuto. La columna se enjuaga con 50 ml de agua desionizada y se eluye con 3 litros de NaCl 0,07M + NH₄Cl 0,005M + NH₃ 0,0001M en agua desionizada, a un caudal de 2 ml/minuto. Se recogen fracciones de 10,8 ml a partir de la primera aplicación del eluyente.

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

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

30

1 El pico principal de antibiótico 890A₁ aparece en
las fracciones 24 a 44, con un máximo en las fracciones 33
a 34. Se combinan para liofilizarlas las fracciones 27 a
38, con las máximas relaciones A₃₀₀/A₂₄₅. Estas fracciones
5 combinadas contienen en total 72 unidades A₃₀₀.

Para realizar la liofilización, las fracciones com-
binadas se concentran a 3,0 ml y el pH del concentrado se
ajusta a 7,5 por adición de 10 microlitros de NaOH 0,1M.
La muestra se divide en 2 partes de 1,50 ml cada una y las
10 partes se congelan rápidamente con independencia y se lio-
filizan en viales de vidrio de tapa de rosca, de 14 ml de
capacidad. Cada muestra contiene 1,73 mg de 890A₁, corres-
pondientes a 35,8 unidades A₃₀₀.

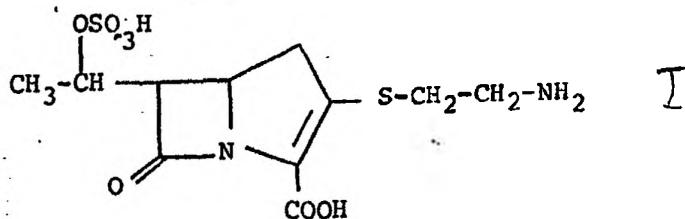
15 Un cultivo de Streptomyces flavogriseus denominado
MA-4600a en la colección de cultivos de Merck & Co., Inc.
ha sido colocado en depósito permanente sin restricciones
en cuanto a su disponibilidad en la colección de cultivos
de los Northern Regional Laboratories, Northern Utilization
20 Research and Development Division, Agricultural Research
Service, Departamento de Agricultura de Estados Unidos,
Peoria, Illinois, y está a disposición del público bajo el
número de accesión NRRL 8140.

En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

25 REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de desace-
til-890A₁₀ de fórmula:

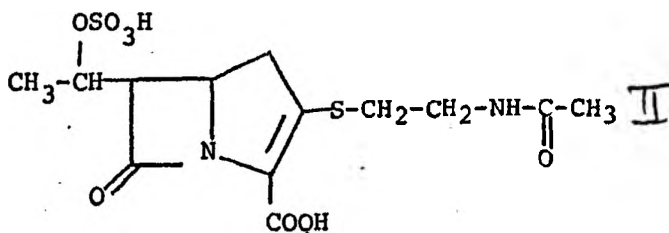
1



5

cuyo procedimiento consiste en someter a reacción de hidrólisis enzimática un compuesto 890A₁₀ de fórmula:

10



por medio de una enzima capaz de hidrolizar al grupo N-acetilo, y que es producido por un microorganismo.

15

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde dicha enzima es una amidohidrolasa.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2, donde la amidohidrolasa es una N-acetiletanolamino-amidohidrolasa.

20

4. Un procedimiento según la reivindicación 2, donde la amidohidrolasa es una N-acetil-890A₁₀-amidohidrolasa.

25

5. Un procedimiento según la reivindicación 1, que se lleva a cabo con una amidohidrolasa producida por una cepa productora de amidohidrolasa del microorganismo Protaminobacter ruber.

30

6. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE DESACETIL 890A₁₀.

1 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de cuarenta y seis
páginas mecanografiadas.

Madrid, 3 febrero 1.978

BERNARDO UNGRIA

p.p.



5

10

15

20

25

30