

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

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

(10) ES	(11) NÚMERO	(12) A1
(21)	471250	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	29-6-78	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:		
(31) NÚMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
76557/77	29.6.1977	JAPON
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(63) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	
(64) TITULO DE LA INVENCION		
PROCESO PARA LA PRODUCCION DE SUSTANCIA MO 696 - SY 2-A		
(71) SOLICITANTE (S)		
La Fundación organizada de acuerdo con las leyes de Japón		
ZAITAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
No. 14-23, 3-chome, Kamiosaki, Shinagawa-ku TOKYO (Japón)		
(72) INVENTOR (ES)		
1.- Hamao Umezawa, de nacionalidad japonesa.		
2.- Masaji Sezaki, " " " "		
3.- Shuntaro Yasuda, " " " "		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
D. FRANCISCO GARCIA CABRERIZO		.S/REF: 74911 *N/REF: O.G. 34.285/AS

- Esta invención se refiere a un proceso para la producción de las sustancias MC 696 - SY 2-A y MC 696 - SY 2-B inhibidoras de la β -lactamasa que es un enzima que ocasiona la disociación del anillo β -lactama presente en los antibióticos de β -lactama incluyendo las penicilinas y cefalosporinas. Más particularmente, esta invención se refiere a un proceso para recuperar y purificar selectivamente la sustancia MC 696 - SY 2-A que actúa como un fuerte inhibidor de la β -lactamasa a partir del caldo de cultivo obtenido mediante el cultivo de una cepa del género Streptomyces que es capaz de producir la sustancia MC 696 - SY 2 y que es descrito en nuestras publicaciones de patentes japonesas pendientes números 24.597/76 y 33.635/76, así como en la patente estadounidense n° 3.928.569.
15. La sustancia MC 696 - SY 2 que hemos descubierto puede inhibir la actividad de la β -lactamasa por lo que su administración junto con las penicilinas y/o cefalosporinas será útil para la quimioterapia de las enfermedades causadas por bacterias resistentes a las penicilinas y cefalosporinas.
20. El término "sustancia MC 696 - SY 2" aquí usado incluye genéricamente la sustancia MC 696-SY 2-A, la sustancia MC 696 - SY 2-B y sus mezclas, a menos que se indique lo contrario.
- Se describen ejemplos de las cepas productoras de la sustancia MC 696 - SY 2 y de las técnicas para el cultivo de las cepas en las publicaciones de patentes japonesas antes mencionadas y en la patente estadounidense antes citada.
25. A título de ejemplo, se esteriliza un medio consistente en 2 % de glicerol, 1,5 % de polvo de soja, 0,26 % de KH_2PO_4 , 0,02 % de K_2HPO_4 , 0,0005 % de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,005 % de aceite de silicona en agua corriente (pH 6,2 aproximadamente). El
- 30.

medio de cultivo es inoculado con "Streptomyces fulvoviridis" cepa MC 696 - SY 2 (depositada en el "Fermentation Research Institute" bajo la denominación FERM-P 1504 y también en la "American Type Culture Collection" bajo la denominación ATCC 21954), que es posteriormente incubada bajo condiciones apropiadas. Al final de la incubación durante 2-5 días se acumuló la sustancia MC 696 - SY 2 en el caldo de cultivo.

La sustancia MC 696 - SY 2 puede ser ensayada para determinar su inhibición de la penicilinasasa (β -lactamasa) por los métodos de valoración yodométrica y el ensayo de placa de agar como se expone más abajo.

1) Método de valoración yodométrica: se colocaron 0,1 ml del inhibidor de penicilinasasa disuelto en un agente tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,0), 0,25 ml de penicilinasasa en el mismo agente tampón (8,000 unidades/ml) preparado a partir de penicilinasasa (300 unidades/mg; Nutritional Biochemical Corp., Ohio, EE.UU.) o a partir de β -lactamasa₇₅ producida por E. coli K-12 W3630 R₇₅ (H. Ogawara, K. Maeda y H. Umezawa; Biochem. Biophys. Acta 289, 203-211, 1972), y 0,4 ml de agente tampón en un tubo de ensayo, y se agitaron suavemente a 37° C durante cinco minutos. A la mezcla se añadieron 0,25 ml de penicilina G sódica (8000 unidades/ml) en el mismo agente tampón y se continuó la agitación durante 35 minutos más. La mezcla fué calentada entonces justamente durante un minuto en un baño de agua hirviendo a 100° C para terminar la reacción.

Se preparó un control sin el inhibidor, un testigo sin penicilinasasa y otro testigo sin el inhibidor o penicilinasasa para dar un volumen de 1 ml con el agente tampón del

- mismo modo que en la solución de la muestra. A todos los tubos de ensayo que contenían el control y los testigos, se añadieron 5 ml de solución de yodo 0,01 N. Al cabo de 15 minutos, se valoró el yodo en exceso con tiosulfato sódico 0,01 N usando solución de almidón al 1 % como indicador. El valor A_s fué calculado a partir de la valoración del testigo (sin penicilinasas o inhibidor) menos la del control (sin el inhibidor) y el valor A_t fué calculado a partir de la valoración de otro testigo (sin penicilinasas) menos la de la muestra que contenía penicilinasas y el inhibidor. Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{A_t}{A_s} \times 100$$

- Mediante la valoración de acuerdo con el procedimiento antes indicado, una muestra de sal sódica de la sustancia MC 696 - SY 2-A de máxima pureza producida por la presente invención indicó una inhibición del 50 % (ID_{50}) en una cantidad de 0,1 - 0,3 mg.
- 2) Método de placa de agar.
20. Se usó penicilinasas (500.000 unidades/ml) adquirida de Tokyo Kasei Co. Se suspendió "Staphylococcus aureus" FDA 209P sobre un declive de agar en 10 ml de solución salina y se usó como organismo de ensayo. Se utilizó el medio de agar para el ensayo de la penicilinasas. Se depositó sobre la placa
25. 10 ml de medio de agar fundido, conteniendo 500 unidades de penicilinasas, 100 unidades de penicilinasas G potásicas y la suspensión del organismo de ensayo (1 %). Al cabo de un período de 15 minutos a 2 horas después de la preparación de las placas, se colocó un disco que contenía una cantidad apropiada
30. del inhibidor sobre el agar. Después de la incubación duran-

te la noche a 37° C, apareció una zona de clara inhibición. Se halló la relación mostrada por la fórmula, $d = \alpha \log C + \beta$ ($\alpha, \beta = \text{constantes}$) entre el diámetro de la zona de inhibición (d) y la concentración del inhibidor (C) del orden de 0,03 - 5,0 unidades/ml de sustancia MC 696 - SY - 2-A. -

5. De acuerdo con el procedimiento de determinación antes citado, se observó que una muestra de sal sódica de la sustancia MC 696 - SY 2-A de máxima pureza tenía una actividad de aproximadamente 10,000 unidades/mg cuando se usó como norma

10. una muestra de sustancia MC 696 - SY 2-A que presentaba una actividad de 1,000 unidades/mg.

En general, la sustancia MC 696 - SY 2 es fácilmente soluble en el agua, existe sustancialmente en la parte líquida del caldo fermentado de "Streptomyces fulvoviridis"

15. cepa MC 696 - SY 2. No es prácticamente extraída con butanol, acetato etílico, éter etílico, cloroformo, benceno, etc. Puede emplearse la extracción con estos disolventes para retirar las impurezas durante la recuperación de la sustancia MC 696 - SY 2 si es necesario. Para la recuperación

20. de la sustancia MC 696 - SY 2, puede obtenerse el filtrado del caldo por filtración o centrifugación del caldo de cultivo para retirar las materias sólidas con los micelios y la sustancia MC 696 - SY 2 en el filtrado del caldo o en otra solución acuosa para su recuperación con ayuda de un

25. adsorbente. Se prefiere como adsorbente el carbón activo, y la sustancia MC 696 - SY 2 adsorbida sobre carbón activo puede ser eluida con acetona acuosa, butanol acuoso, propanol acuoso, etc., especialmente teniendo buen rendimiento con 30 % de propanol en agua a un pH de casi 7,0. Sobre la

30. base del carácter ácido de la sustancia MC 696 - SY 2, se -

dispone también de las sustancias de intercambio aniónico y de las celulosas de intercambio aniónico para efectuar la recuperación de la sustancia MC 696 - SY 2. Con tal objeto, son útiles las resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas tal como la "Amberlite" IRA-401 (Rohm & Haas CO., EE.UU.), las resinas de intercambio aniónico débilmente básicas tal como la "Amberlite" IR-4B (Rohm & Haas CO., EE.UU.), DEAE-celulosa (Brow CO., Ltd.) etc.

Hemos descubierto ahora que cuando la sustancia -
 10. MC 696 - SY 2 tiene que ser recuperada a partir del caldo de cultivo que contiene la sustancia MC 696 - SY 2-A, esta sustancia puede ser estabilizada durante las etapas de recuperación y purificación mediante su conversión en una sal, particularmente una sal con un catión de metal alcalino o -
 15. metal alcalino-térreo, por ejemplo, catión sodio y bario.

De acuerdo con un aspecto más amplio de esta invención, se proporciona por consiguiente un proceso para la -
 producción de la sustancia MC 696 - SY 2-A, que consiste en cultivar la cepa MC 696 - SY 2 de "Streptomyces fulvoviridis" (identificada por FERM-P 1504 o ATCC 21954) para producir y acumular la sustancia MC 696 - SY 2-A en el medio de cultivo, y recuperando después esta sustancia a partir del caldo de cultivo que contiene la sustancia MC 696 - SY 2-A mientras que esta sustancia es mantenida bajo la forma de -
 20. una sal de sustancia MC 696 - SY 2-A después de convertir esta sustancia en la sal en una fase anterior apropiada del proceso de recuperación y purificación.

Hemos descubierto también que la sustancia MC 696 - SY 2-A del caldo de cultivo o del filtrado del caldo puede ser adsorbida preferencialmente sobre una resina de in-
 30.

tercambio aniónico fuertemente básica, por ejemplo, Amberlite IRA-401 (forma de sulfato), que es posteriormente eluida con una solución acuosa de cloruro amónico, cloruro sódico o sulfato amónico y preferiblemente cloruro amónico -
 5. acuoso 2M para recuperar la sustancia MC 696 - SY 2-A sola con buen rendimiento.

Con el fin de separar la sustancia MC 696 - SY 2-A a partir de las sales inorgánicas, se dispone del carbón activo como se ha mencionado anteriormente, aunque también se
 10. dispone para tal fin de un tamiz molecular tal como "Sephadex" G 25 (Pharmacia Chemicals) y un adsorbente sintético - tal como "Amberlite" XAD-2 (Rohm & Haas Co.). Se ha descubierto que la resina "Diaion" HP-20, que es una resina de poliestireno no iónica fabricada por Mitsubishi Kasei Co.
 15. Ltd., permite la recuperación de la sustancia MC 696 - SY 2-A de pureza incrementada con un rendimiento muy bueno. Hemos descubierto también que por el tratamiento de etapas - múltiples usando Floridil (silicato de magnesio activado), ECTEOLA-celulosa (Braun Co.) y Sephadex G-25 en combinación
 20. cuando se conduce el tratamiento en cada etapa con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida en forma de sal de bario, por ejemplo Amberlite IR-120 B o Dowex 50W x 4 (forma de sal de Ba) para dar la sustancia MC 696 - SY
 2-A bajo la forma de sal de bario, la actividad de la sustancia MC 696 - SY 2-A se mantiene de forma más constante -
 25. que en el caso desprovisto del tratamiento.

Los experimentos han demostrado que la sal de bario cruda de la sustancia MC 696 - SY 2-A (aproximadamente 400 unidades/mg) es tratada con Dowex 50W x 4 (forma de sal
 30. de Na) para convertir la sal de bario en su sal de sodio, -

- que es sometida a la cromatografía de columna con Sephadex LH 20 usando 85-95 %, preferiblemente 91 % de metanol acuoso como disolvente de revelado o a la cromatografía de columna con Sephadex LH 20 y con gel de sílice usando 85-95 %,
5. preferiblemente 92 % de acetonitrilo acuoso como disolvente de revelado, por medio de lo cual se recupera con buen rendimiento la sustancia MC 696 - SY 2-A de alta pureza que puede alcanzar una actividad de hasta aproximadamente 10000 - unidades/mg. El procedimiento que utiliza el acetonitrilo -
10. acuoso es útil para obtener la sustancia MC 696 - SY 2-A incolora.

- En una primera forma de realización preferida de la invención, se ajusta el filtrado del caldo de cultivo de "Streptomyces fulvoviridis" cepa MC 696 - SY 2 (depositada
15. bajo la denominación FERM-P 1504 ó ATCC 21954) con ácido diluido tal como ácido sulfúrico a un valor de pH ligeramente ácido y se trata con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, por ejemplo, Amberlite IRA-400 o IRA-401 - (forma de sulfato) para adsorber sobre la misma la sustancia
20. MC 696 - SY 2-A. La resina es eluida con una solución acuosa de cloruro amónico, cloruro sódico o sulfato amónico y las fracciones activas recogidas del eluado son tratadas con carbón activo para adsorber sobre el mismo la sustancia deseada, que es posteriormente extraída en acetona acuosa.
25. El extracto es tratado con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida, por ejemplo Amberlite IR-120 B o Dowex 50W x 4 bajo la forma de sal de bario para convertir la sustancia MC 696 - SY 2-A en su sal de bario y el extracto de acetona así tratado es concentrado hasta la sequedad
30. para dar un polvo crudo que comprende la sal de bario de la

sustancia MC 696 - SY 2-A.

El polvo crudo es disuelto en agua y la solución -
 es pasada a través de una columna de una resina adsorbente
 porosa no iónica para adsorber sobre la misma la sal de ba-
 5. rio. La resina es posteriormente eluida con agua desioniza-
 da y las fracciones activas recogidas del eluado son trata-
 das con una resina de intercambio catiónico fuertemente áci-
 da, por ejemplo Dowex 50W x 2 (forma de sal de bario) y con-
 centradas hasta la sequedad para dar un polvo crudo secunda-
 10. rio.

El polvo crudo secundario es sometido al revelado
 con acetona acuosa en una columna de silicato de magnesio -
 activado, por ejemplo Floridil y las fracciones activas re-
 cogidas del eluado son tratadas con resina de intercambio -
 15. catiónico fuertemente ácida, por ejemplo Dowex 50W x 2 (for-
 ma de sal de bario) y deshidratadas para dar un polvo crudo
 terciario.

Se mezcla una solución acuosa del polvo crudo ter-
 ciario con un agente tampón de fosfato (pH 7,0) y la solu-
 20. ción mezclada es revelada con el mismo agente tampón de fos-
 fato en una columna de un tamiz molecular celulósico, por -
 ejemplo ECTEOLA-Celulosa. Las fracciones activas recogidas
 del efluente son concentradas y el concentrado es revelado
 con agua desionizada en una columna de resina adsorbente po-
 25. rosa no iónica, tal como resina Diaion HP-20. Las fraccio-
 nes activas del efluente son tratadas con una resina de in-
 tercambio catiónico fuertemente ácida (forma de sal de Ba),
 posteriormente concentradas y cromatografiadas en una colum-
 na de un tamiz molecular fabricado con un derivado de dex-
 30. trano, por ejemplo Sephadex G-25, seguido del tratamiento -

posterior con resina de intercambio catiónico fuertemente ácida (forma de sal de Ba). La solución resultante de la sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A así purificada es deshidratada para dar un polvo blanco y puro de sustancia MC 5. 696 - SY 2-A bajo la forma de sal de bario (véase los ejemplos 1-5 facilitados más adelante).

En una modificación de la primera realización descrita anteriormente, la etapa del tratamiento del polvo crudo secundario para dar el terciario puede ir precedida por 10. un tratamiento preliminar intermedio en el que el polvo crudo secundario se disuelve en metanol acuoso en una columna de un tamiz molecular dextránico tal como Sephadex LH-20, y las fracciones activas del efluente son tratadas con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida (por ejemplo 15. Dowex 50W x 4) en forma de sal de Ba y luego deshidratadas para dejar un polvo crudo.

En una segunda realización de la invención, el polvo crudo terciario obtenido de acuerdo con la primera realización es sometido al revelado con acetona acuosa en una columna de silicato de magnesio activado (por ejemplo Floridil) 20. y las fracciones activas recogidas del efluente son tratadas con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida tal como Dowex CG 50 en forma de sal de Ba y posteriormente concentradas. El concentrado es revelado con agua desionizada en una columna de un tamiz molecular dextránico tal como 25. Sephadex G-25 y las fracciones activas del efluente son tratadas de nuevo con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida (forma de sal de Ba) y posteriormente deshidratadas para dar un polvo blanco de sustancia MC 696 - SY 2-A 30. en forma de sal de Ba (véase el ejemplo 7).

La sustancia MC 696 - SY 2-A, que es de naturaleza fuertemente ácida, forma fácilmente sales con cationes metálicos alcalinos, por ejemplo, catión sodio, potasio o litio, catión amonio y similares como cationes monovalentes y con cationes de metales alcalino-térreos, por ejemplo, catión -bario o calcio y similares. En consecuencia, se estabiliza bajo la forma de su sal. En particular, el tratamiento de la sustancia MC 696 - SY 2-A para formar su sal de bario como ya se ha indicado sirve para la estabilización.

10. La sal de Na y la sal de Ba de la sustancia MC 696 - SY 2-A tienen las propiedades físico-químicas expuestas en la tabla 1 que sigue. Cuando estas sales fueron tratadas con clorhidruro de hidroxilamina, tanto la absorción a 280 nm en sus espectros infrarrojos como la actividad de inhibición desaparecieron perfectamente. En el espectro de absorción infrarroja de la sal de Ba, la absorción a 1770 cm^{-1} debida a la presencia del anillo de lactama permaneció como tal incluso cuando se midió el disco de KBr de la sal de Ba después de permanecer en reposo a temperatura ambiente durante 22 días (véase las figuras 1 y 2 del dibujo anexo).

TABLA 1

Propiedades físico-químicas de la sustancia MC 696 - SY 2-A

Propiedades	Sal de Ba	Sal de Na
25. Apariencia	Polvo blanco	Polvo blanco
Punto de fusión	Sin punto de fusión definido	Sin punto de fusión definido
30. Descomposición	Descomposición gradual por encima de	Descomposición gradual a casi 148° C

Propiedades	Sal de Ba	Sal de Na
	150° C	
5. Actividad específica	$[\alpha]_D^{27} = -109^{\circ} (c=1, H_2O)$	$[\alpha]_D^{27} = -110^{\circ} (c=0,25, H_2O)$
Análisis elemental	$C_{13}H_{14}N_2O_9S_2 \cdot Ba \cdot H_2O$	$C_{13}H_{14}N_2O_9S_2 \cdot Na_2 \cdot 3H_2O$
	Calc. (%) Hallad. (%)	Calc. (%) Hallad. (%)
10.	C 27,79 27,73	C 30,83 31,00
	H 2,87 3,33	H 3,98 3,98
	N 4,99 4,82	N 5,53 5,26
	Ba 24,45 23,80	S 12,66 12,08
Solubilidad	Soluble en agua	Fácilmente soluble en agua
15.	Insoluble en metanol, etanol, butanol, acetato etílico, éter, cloroformo, benceno, et.	
Reacciones de color	Positiva a las reacciones de Marlich, Rydon-Smith, nitrato de plata-fluoresceína y permanganato potásico.	
20. Espectro de absorción ultravioleta (solución acuosa)	240 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 270$)	240 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 305$)
Espectro de absorción infrarroja (disco KBr)	280 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 214$)	280 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 220$)
25.	3500, 3000, 1770, 1695	3400, 2950, 1765, 1690
	1625, 1590, 1520, 1405	1620, 1510, 1390, 1260
	1385, 1265, 1230, 1070	1220, 1060, 1035, 1020
	1040, 1025, 980, 940	970, 930, 900, 780
	900, 790.	

La figura 1 muestra el espectro de absorción infrarroja (disco KBr) de la sal sódica de la sustancia MC 696 -

SY 2-A preparada por la presente invención y la figura 2 muestra el de la misma sal sódica una vez que el disco KBr de la misma fué dejado en reposo en un desecador a temperatura ambiente durante 22 días.

5. Los espectros $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ de las sales de Ba y Na de la sustancia MC 696 - SY 2-A producida por la invención son relacionados seguidamente en las tablas 2 y 3 respectivamente.

TABLA 2

10. Espectro $^1\text{H-NMR}$ de la sustancia MC 696 - SY 2-A

Protón	Sal de Ba (δ , ppm)	Sal de Na (δ , ppm)
CH_3	1.98 d, J = 6	1.99 d, J = 6
15. COCH_3	2.60 s	2.59 s
CH_2	{ 3.53 dd, J = 10, 18 3.98 dd, J = 9, 18	{ 3.54 dd, J = 10, 18 3.98 dd, J = 9, 18
CH	4.44 dd, J = 6, 9	4.42 dd, J = 6, 9
CH	4.96 m, J = 6	4.94 m, J = 6
20. CH	5.38 m, J = 6, 8	5.39 m, J = 6, 9
OH	6.87 d, J = 14	6.85 d, J = 14
OH	8.07 d, J = 14	8.05 d, J = 14

Medido en D_2O con referencia a TMS ($\delta = 0$).

- 25.

TABLA 3

- Espectro $^{13}\text{C-NMR}$ de la sustancia MC 696 - SY 2-A.

Carbono	Sal de Ba(δ)		Carbono	Sal de Na(δ)	
	Sal de Ba(δ)	Sal de Na(δ)		Sal de Ba(δ)	Sal de Na(δ)
30. 1	177,7	177,4	8	73,7	73,7

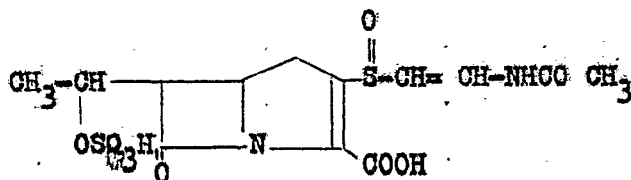
		Carbono Sal de Ba(s) Sal de Na(s)		Carbono Sal de Ba(s) Sal de Na(s)	
	2	173,5	173,5	9	59,0
5.	3	166,1	165,9	10	54,6
	4	141,1	139,0	11	29,6
	5	139,1	135,6	12	23,0
	6	135,0	135,0	13	19,1
	7	112,1	112,3		

10.

Medido en D₂O con referencia al dioxano ($\epsilon = 67,4$).

A la vista de las propiedades descritas anteriormente y las de unos pocos productos de descomposición de la sustancia MC 696 - SY 2-A, se confirma que la sustancia MC 696 - SY 2-A tiene la siguiente fórmula estructural:

15.



20.

Con respecto a la sal de Ba (que tiene una actividad de 12.400 u/mg) y a la sal de Na (que tiene una actividad de 10.000 u/mg) y muestra una ID₅₀ de 0,39 nonagramo de la sustancia MC 696 - SY 2-A, se determinaron las concentraciones inhibitoras mínimas para el crecimiento de varios microorganismos por el método de dilución de agar usando medio de agar común. Los resultados están expuestos en la tabla 4. Además, las concentraciones inhibitoras mínimas de la sal de Na (ID₅₀ : 0,36 ng) determinadas por el método de dilución de agar usando me-

30.

dio de agar de Infusión Heart están relacionadas en la tabla 5.

TABLA 4

Espectros antimicrobianos de las sales de Ba y Na de la sustancia MC 696 - SY 2-A.

<u>Organismos del ensayo</u>	<u>Concentraciones inhibitoras mínimas (μg / ml)</u>	
	<u>Sal de Ba</u>	<u>Sal de Na</u>
Micrococcus flavus FDA/6	25	50 (25 - 63)
10. Micrococcus lysodeikticus IFO3333	25	50 (25)
Sarcina lutea PCI 1001	25	25
Bacillus anthracis	50	(100 - 25)
Bacillus cereus ATCC 10702	100	(100 - 25)
15. Bacillus subtilis PCI 219	25	(100 - 25)
Klebsiella pneumoniae PCI 602	100	(100)
Proteus mirabilis No S-2201	100	(100)
Proteus vulgaris O x 19	100(50)	(100 - 50)
Proteus rettgeri GN 466	100(50)	> 100
20. Salmonella typhimurium T-63	100(50)	(100 - 50)
Escherichia coli NIHJ	100	> 100
Escherichia coli W3630	100	100
Pseudomonas aeruginosa 4-cepa	> 100	> 100
Mycobacterium smegmatis 607	> 100	> 100

25. Los valores dados entre paréntesis muestran las concentraciones inhibitoras parciales.

TABLA 5

Espectros antimicrobianos de la sal de Na de la sustancia MC 696 - SY 2-A.

<u>Organismos del ensayo</u>	<u>Concentraciones inhibitoras mínimas (μg / ml)</u>	
	<u>24 horas después</u>	<u>48 horas</u>
	<u>de la incubación</u>	
5. Staphylococcus aureus SMITH	50	> 100
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	25	> 100
Staphylococcus aureus S-642	50	> 100
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	50	> 100
10. E. coli NIHJ	12.5	100
E. coli K-12 ML 1629	25	> 100
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	25	> 100
Proteus vulgaris OX - 19	1.6	50
Salmonella typhimurium 1406	12.5	> 100
15. Shigella flexneri 1674	12.5	> 100
Bacillus subtilis ATCC 6633	12.5	50
Bacillus cereus ATCC 10702	> 100	> 100
Sarcina lutea ATCC 9341	12.5	50
Micrococcus flavus ATCC 10240	12.5	100
20. Pseudomonas aeruginosa	> 100	> 100

Se evaluó el efecto de la sustancia MC 696 - SY 2-A sobre la actividad inhibitora de las penicilinas contra diversos microorganismos. Con tal fin, se determinaron las concentraciones de inhibición mínimas (MIC) a los microorganismos del ensayo para la ampicilina, benzilpenicilina y carbenicilina a cada una de las cuales se añadió la sustancia MC 696 - SY 2-A en unidades de 0, 0,01, 0,1 y 1,0. Los resultados aparecen en la tabla 6, que indica la considerable mejora de la actividad inhibitora por la adición de la sustancia

30. MC 696 - SY 2-A.

30. 25. 20. 15. 10. 5.

TABLA 6

Efecto sinérgico de la sustancia MC 696 - SX 2-A sobre la actividad inhibidora de las penicilinas.

Microorganismos del ensa	M I O (μ g / ml)	
	Penicilinas	Ampicilina (actividad 867 μ g* / mg)
YO. Sustancia MC 696 .	0	0,01 . 0,1
- SY 2 (Unidad)		
1. E. coli K-12 W 3630	1,56	0,78
2. E. coli K-12 W 3630 RGN238 ⁺	>100	(100)
3. Proteus rettgerii GN 624	(100)	(100)
4. Proteus morgani EM 926	>100	100 (50)
5. Proteus vulgaris GN 76	>100	50(25) 6,25(3,12)
6. Providence GN 327	12,5(6,25)	1,25(6,25) 3,12(1,56)
7. Serratia GN 633	100	100
8. Klebsiella pneumoniae GN 69	>100	>100
9. Staphylococcus aureus S-642	0,1(0,05)	0,1(0,05) 0,05

30. 25. 20. 15. 10. 5.

TABLA 6 (Continuación)

Microorganismos del ensayo	M I O (μ g / ml)					
	Bencilpenicilina (actividad 667 u/mg)	0	0,1	1,0	12,5	Carbenicilina (actividad 804 μ g/mg)
1. E. coli	25	25 (12,5)	12,5	3,12	12,5	6,25 (3,12) 6,25 3,12 (1,56)
2. E. coli	(100) > 100	100	100	25	> 100	> 100 > 100 50(25-12,5)
3. Proteus	> 100	> 100	> 100	> 100	50	25 25 12,5
4. Proteus	> 100	> 100	> 100	50(25)	6,25	3,12 3,12 0,78
5. Proteus	100 50	3,12	1,56	1,56	25	(3,12-0,78) (1,56-0,78) (1,56-0,78) 12,5(6,25) 6,25 0,39
6. Providence	100 100	25(12,5)	1,56	1,56	1,56	0,78(0,39) 0,78(0,39) 0,39(0,2)
7. Serratia	> 100 > 100	> 100	> 100	> 100	50(25)	50(25) 50(25) 50(25)
8. Klebsiella	> 100 > 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100 > 100 > 100
9. Staphylococ.	< 0,78 < 0,78	< 0,78	< 0,78	< 0,78	0,78(0,39)	0,39 0,39 0,2(0,1)

Se condujeron ensayos adicionales en los que se infectaron ratones con *Staphylococcus* 1930 y en los que, 90 minutos después de la infección, se administró bencilpenicilina por vía intraperitoneal a los ratones sola o en combinación con la sustancia MC 696 - SY 2-A a una dosis de 75 unidades/ratón o se administró esta última (vía intraperitoneal) sola a los ratones. 48 horas después de la administración se contó el número de supervivencia de los ratones. Los resultados del ensayo son expuestos en la tabla 7, que muestra la mejora en la actividad antibacteriana de la bencilpenicilina por combinación con la sustancia MC 696 - SY 2-A.

TABLA 7

Efecto de la sustancia MC 696 - SY 2-A sobre la actividad protectora de la bencilpenicilina para los ratones infectados con *Staphylococcus* 1930.

	Bencilpenicilina (Unidades/ratón)	Número de supervivencia/Número del ensayo	
		Sustancia MC 696 - SY 2-A	
		0	7,5 unidades/ratón
20.	0	0/8	0/4
	20	0/4	1/4
	78	0/4	1/4
	313	0/4	1/4 [⊕]
	1250	1/4 [⊕]	4/4
25.	5000	4/4 ^{⊕⊕⊕}	4/4

En la tabla anterior, el símbolo ⊕ indica que el ratón está muriendo, ⊕ indica que el ratón está debilitado y ⊕ indica que el ratón tiene el pelo levantado y ha quedado ciego pero no está considerablemente debilitado.

Esta invención es ilustrada adicionalmente por los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

Se disolvió en agua desionizada una mezcla de 1,0% de glicerol, 3,0% de licor de embrión de maiz, 0,05% de K_2HPO_4 , 0,0005% de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ y aceite de silicona KM-72 (Shinetsu Kagaku K.K.) y la solución fué vertida en fracciones de 80 ml en matraces Sakaguchi de 500 ml y esterilizada a 120° C durante 15 minutos (pH $6,2 \pm 0,2$). El medio de cultivo líquido resultante fué inoculado con una porción de organismo tomada de un cultivo en declive de *Streptomyces fulvoviridis* cepa MC 969 - SY 2 (depositada bajo la denominación FERM-P 1504 y bajo la denominación ATCC 21954) y luego fué cultivado con agitación a 28° C durante 26 horas con 135 oscilaciones por minuto para dar un cultivo de siembra primario.

Se esterilizó otro medio de cultivo líquido (50 l.) que tenía la misma composición que antes, a 120° C durante 30 minutos en un tanque de fermentación de acero inoxidable de 130 litros de capacidad y luego se ajustó a un pH del orden de $6,2 \pm 0,2$. Se inocularon 70 ml (0,14% en volumen) del cultivo de siembra primario en dicho medio de cultivo líquido, seguido de la incubación a 28° C bajo una presión interna de 1,5 kg/cm² con aireación (100%) y agitación a una cadencia de 200 revoluciones/minuto y usando como anti-espumante Adecanol LG 109 (Asahi Denka K.K.) en medios anti-espumantes automáticos para dar un cultivo de siembra secundario.

Se dispuso otro medio de cultivo líquido (300 l.) consistente en 2,0% de glicerol, 1,5% de harina de soja, -

- 0,26% de KH_2PO_4 , 0,02% de K_2HPO_4 , 0,0005% de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y -
 0,005% de aceite de silicona KM-72 disuelto en agua corrien-
 te, en un tanque de fermentación de acero inoxidable de 570
 l. de capacidad y se esterilizó a 120° C durante 30 minutos
 5. (pH 6,2 \pm 0,2). Se inocularon 6 litros (2% en volúmen) de -
 dicho cultivo de siembra secundario en el medio de cultivo
 líquido, que fué posteriormente incubado durante 48 horas -
 a 28° C bajo una presión interna de 0,5 kg/cm² con aireación
 (300 l/minuto) y agitación a una cadencia de 220 revolucio-
 10. nes/minuto y usando el mismo antiespumante indicado más arri-
 ba. Después de 20 horas y 33 horas en el curso de la incuba-
 ción, se ajustó el medio de cultivo a un pH comprendido den-
 tro de la gama de 6,1 \pm 0,1 por adición de solución de áci-
 do cítrico acuoso al 10%. Al caldo de cultivo resultante -
 15. (pH 5,75, 300 ml, 140 u/ml) se añadieron 21 kg de Hifro-su-
 percel como producto filtrante y la mezcla fue filtrada a -
 través de una prensa filtradora para retirar las materias -
 sólidas que contenían micelios. Se obtuvieron así 240 l. -
 del filtrado del caldo (pH 5,45, 90 u/ml) correspondientes
 20. a un rendimiento de filtración del 51,4 %.

EJEMPLO 2

- Se ajustaron 480 l. del filtrado del caldo (pH 5,45
 90 u/ml) obtenido por el procedimiento del ejemplo 1 a un -
 pH de 5,2 con ácido sulfúrico diluido, a lo que se añadie-
 25. ron 5 l. de resina de intercambio iónico Amberlite IRA-401
 (forma de sulfato, Rohm & Haas Co.). La mezcla fué agitada
 durante 30 minutos y filtrada para retirar la resina, que -
 fué posteriormente lavada con 50 l. de agua desionizada y -
 empaquetada en una columna (9,0 x 80 cm). La columna fué -
 30. eluída con cloruro amónico 2M a 5° C, el eluado fué recogi-

- do en fracciones de 500 ml y las fracciones activas 8-112 fueron combinadas para dar 52 l. de una solución activa (pH 5,4, 796 u/ml). La solución activa fué mezclada con 1 kg de carbón activo (Waco Junyaku K.K.) y agitada durante
5. 30 minutos para adsorber la sustancia activa sobre el carbón. El carbón activo fué separado por filtración, lavado con 50 l. de agua y suspendido en 18 l. de acetona acuosa al 50%. Se ajustó la suspensión a un pH de 8,0 con amoníaco acuoso diluido y luego se agitó a 40° C durante 30 minutos para permitir la extracción de la sustancia activa, seguido de la filtración para retirar el carbón activo que fué lavado con una pequeña cantidad de acetona. El extracto y el producto de lavado fueron combinados entre sí y la solución combinada (17 l. pH 7,6, 1260 u/ml) fué mezclada
10. con un litro de resina de intercambio iónico Amberlite IR-120 B (forma de sal de Ba, Rohm & Haas Co.) y agitada durante 30 minutos. Posteriormente, la resina fue separada por filtración y el filtrado (17 l, pH 6,86, 1811 u/ml) fué concentrado a 300 ml a 40° C bajo presión reducida. El
15. concentrado (pH 4,5, 4000 u/ml) fue secado por congelación para dar un polvo de color marrón (rendimiento 43,9%) comprendiendo la sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A.
- 20.

EJEMPLO 3

- El polvo de color marrón (6,8 gr, 680 u/mg) obtenido en el ejemplo 2 fué disuelto en 10 ml de agua y la solución (pH 5,4) fué ajustada a un valor pH de 3,0 con ácido clorhídrico acuoso 1 N y luego pasada a través de una columna (1,7 x 40 cm) cargada con 90 ml de partículas finas de resina de poliestireno no iónica (resina Diaion HP-
25. 20 - Mitsubishi Kasei K.K.). La columna fué lavada con agua
- 30.

desionizada a 5° C y el efluente fue recogido en fracciones - de 8 ml. Las fracciones activas predominantes 17-25 fueron - combinadas entre sí y tratadas con agitación durante 30 minutos con 20 ml de resina Dowex 50 W x 4 (forma de sal de Ba, - 5. Dow Chemical Co.). La resina fué separada entonces por filtración y el filtrado fué concentrado por evaporación a 40° C y secado por congelación para dar 766 mg (rendimiento 70,2%) de un polvo de color marrón amarillento (4240 u/mg).

EJEMPLO 4

10. Se combinaron 766 mg del polvo (4240 u/mg) obtenido en el ejemplo 3 con 887 mg de otro (2480 u/mg) preparado del mismo modo. El polvo combinado (1,55 gr) fué mezclado completamente con 10 ml de Floridil (marca registrada de Floridin - Co.) y la mezcla fué colocada en la parte superior de una columna de 100 ml de volúmen (1,7 x 45 cm) llena con acetona acuosa al 80% para someterla al revelado con la acetona acuosa a 5° C. El eluado fué recogido en fracciones de 10 ml y - las fracciones activas predominantes 8-27 fueron combinadas - entre sí, añadiéndosales después 50 ml de Dowex 50 W x 4 (for 15. ma de Ba), seguido por la concentración a una temperatura inferior a 40° C. El concentrado fué filtrado para retirar la - resina y secado por congelación para dar 181 mg (rendimiento 22,3%) de un polvo amarillo (6700 u/mg).

EJEMPLO 5

25. Se disolvieron 181 mg del polvo (6700 u/mg) preparado en el ejemplo 4 en 5 ml de agua y la solución fué tratada completamente con agente tampón de fosfato 0,01 M (pH 7,0) y luego pasada a través de una columna (1,7 x 45 cm) de 100 ml de ESTEOLA - Celulosa (Brown Co.) previamente lavada con agua. 30. La columna fué lavada con 300 ml de agua y revelada con el -

- mismo agente tampón a 5° C. El eluado fué recogido en fracciones de 10 ml y las fracciones activas predominantes 21-42 fueron combinadas entre sí y concentradas a 5 ml en volumen a menos de 40° C bajo presión reducida. El concentrado
5. fué pasado a través de una columna (1,3 x 38 cm) de 50 ml de resina Diaion HP-20, seguido del revelado con agua desionizada a 5° C. El eluado fué recogido en fracciones de 5 ml y las fracciones activas predominantes 11-14 fueron combinadas, mezcladas y agitadas durante 30 minutos con 5 ml de
10. Dowex 50 W x 4 (forma de Ba). Posteriormente, la resina fue separada por filtración y el filtrado fué concentrado a 5 ml a 40° C bajo presión reducida. El concentrado fué pasado a través de una columna (1,7 x 66 cm) de 150 ml de Sephadex G-25 (Super fino) y la columna fué aclarada con agua desionizada a 5° C. El efluente fué recogido en fracciones de
15. 5 ml y las fracciones activas predominantes 24-30 fueron combinadas, a lo que se añadieron 9 ml de Dowex 50 W x 4 (forma de Ba). La mezcla resultante fué agitada durante 30 minutos, después de lo cual fué filtrada para retirar la resina y concentrada en 2 ml a 40° C bajo presión reducida.
20. El secado por congelación del concentrado dió 34,7 mg. (rendimiento 38,3%) de un polvo blanco (13.360 u/mg) que mostró
- $$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} (E_{1\%}^{1\text{cm}}) = 242 \text{ nm (270)} \text{ y } 280 \text{ nm (214)} \text{ en el espectro ultravioleta y una } ID_{50} = 0,3 \text{ ng determinado por el método}$$
25. de valoración yodométrica.

EJEMPLO 6

- Se disolvieron 385 mg de polvo (7480 u/mg) preparado como en el ejemplo 3 en 5 ml de metanol al 90% y las materias insolubles fueron separadas por filtración. La solución obtenida fué pasada a través de una columna (25 ml, -
- 30.

1,0 x 32 cm) de Sephadex LH-20, seguido del revelado con metanol al 90% a 5° C. El eluado fué recogido en fracciones de 15 ml y las fracciones activas 4-19 fueron combinadas, tratadas con Dowex 50 W x 4 (forma de Ba), concentradas a 40° C y secadas por congelación para dar 107 mg (41,6%) de un polvo de color marrón amarillento (11.200 u/mg). Otras fracciones activas 20-49 fueron tratadas igualmente para dar 66,8 mg (19,1%) de otro polvo de color marrón amarillento (8225 u/mg). El polvo (107 mg) obtenido a partir de las fracciones 4-19 fué mezclado con 3 ml de Floridil, después de lo cual fué colocado en la parte superior de una columna (1,0 x 38 cm) de 30 ml de Floridil y revelado con acetona acuosa al 80% a 5° C. El eluado fué recogido en fracciones de 5 ml y las fracciones activas 4-8 fueron combinadas, tratadas con la resina en forma de bario, después de lo cual fueron concentradas por evaporación de la acetona y secadas por congelación para dar 48,8 mg (48,9%) de un polvo de color amarillo pálido (1200 u/mg).

El polvo (66,8 mg) obtenido a partir de las fracciones 20-49 fué tratado del mismo modo que antes con la excepción de que se usó acetona acuosa al 90% como disolvente de revelado, dando 21,6 mg (29,1%) de otro polvo de color amarillo pálido (7400 u/mg).

Estos polvos de color amarillo pálido fueron combinados (65 mg) y disueltos en 2 ml de agua. La solución fué pasada a través de una columna (50 ml, 1,0 x 64 cm) de Sephadex G-25 (Super fino) y la columna fué aclarada con agua desionizada. El efluente fué recogido en fracciones de 3 ml (5° C) y las fracciones activas predominantes 17-18 fueron combinadas y secadas por congelación para dar 23,7 mg de

- un polvo blanco (12500 u/mg). Rendimiento 39,7% (rendimiento total 10,2%); $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} (E_{1\text{cm}}^{1\%}) = 240 \text{ nm (292)}, 280 \text{ nm (200)}$; $\text{ID}_{50} = 0,5 \text{ ng}$. La absorción característica a 1770 cm^{-1} debida al anillo de β -lactama en el espectro infrarrojo (disco KBr) del polvo blanco no desapareció incluso después de permanecer en reposo a temperatura ambiente durante 3 semanas - aproximadamente (véase las figuras 1 y 2).

EJEMPLO 7

- Se colocaron 387 mg de un polvo amarillo (4320 u/mg) preparado por un procedimiento similar descrito en el ejemplo 4 en la parte superior de una columna (50 ml, 1,3 x 38 cm) cargada con 5 ml de Floridil y revelada con acetona acuosa al 80% a 5^o C. El eluado fué recogido en fracciones de 10 ml y las fracciones activas 3-8 fueron combinadas y tratadas con una resina en forma de Ba, después de lo cual fueron filtradas y concentradas a 5 ml por debajo de 40^o C. El concentrado fué pasado a través de una columna (50 ml, 1,0 x 69 cm) de sephadex G-25 (Super fino) y la columna fué lavada con agua desionizada. El efluente de la columna fué recogido en fracciones de 3 ml (5^o C) y las fracciones activas predominantes 18-19 fueron combinadas y mezcladas con 1,5 ml de Dowex 50 W x 4 (forma de Ba). Después de la agitación durante 30 minutos, la resina fué separada por filtración y el filtrado fué concentrado a 2 ml por debajo de 40^o C. El secado por congelación del concentrado dió 51,6 mg (42,0%) de un polvo blanco (13600)u/mg) de sustancia MC 696 - SY 2-A en forma de sal de bario. $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} (E_{1\text{cm}}^{1\%}) = 242 \text{ nm (254)}, 280 \text{ nm (194)}$; $\text{ID}_{50} = 0,5 \text{ ng}$.

EJEMPLO 8

30. Se disolvieron 2,49 gr de un polvo crudo de la sal

- de bario (400 u/mg, $ID_{50} = 81$ ng) preparado como en el ejemplo 2, en aproximadamente 20ml de agua y la solución fue — ajustada a un valor pH de 6,2 y posteriormente pasada a —
5. través de una columna (2x30 cm.) de Dowex 50 W x 4 (forma — de Na, 50-100 mallas) a una cadencia de 1,4 ml/minuto. Se — recogieron del efluente fracciones activas que fueron secadas por congelación para dar 2,2362 gr (95,2%) de la sal sódica de la sustancia MC 696 - SY 2-A (424 u/mg, $ID_{50} = 65$ ng). — Siguiendo el procedimiento anterior, se obtuvieron 2,366 gr
10. (94,6%) de la sal sódica (400 u/mg) a partir de 2,501 gr de la sal de bario cruda. A partir de las dos cosechas de las sales de bario, se obtuvieron en total 2,60 gr de la sal sódica de sustancia MC 696-SY 2-A (actividad media 412 u/mg).

EJEMPLO 9

15. Se sometieron 262 mg del polvo de sal sódica (412 u/mg) obtenido en el ejemplo 8 al revelado con metanol al — 91% a 5°C en una columna (2 x 22 cm) de Sephadex IH-20 — (Pharmacia Co., 25-100^μ). El eluado fue recogido en frac— ciones de 300 gotas y las fracciones que presentaban tanto
20. la actividad deseada como la absorción ultravioleta a 280 nm fueron combinadas entre sí y secadas por congelación. — Rendimiento de la sal sódica: 92,4 mg en las fracciones 17-19 (130 u/mg), 46,9 mg en las fracciones 20-21 (952 u/mg), 27,8 mg en las fracciones 22-23 (1136 u/mg), 9,1 mg en las
25. fracciones 24-26 (285u/mg); rendimiento total 86,7%.

- Se repitió el procedimiento anterior 18 veces usan— do 4,60 gr del polvo crudo de la sal sódica (412 u/mg) obte— nida en el ejemplo 8. Los polvos que tenían una actividad — no inferior a 400 u/mg fueron combinados para dar 1,412 gr
30. (73% de la sal sódica (actividad media 980 u/mg).

EJEMPLO 10

Se recogieron 251,9 mg del polvo de sal sódica (980 u/mg) obtenido en el ejemplo 9 en una pequeña cantidad (aproximadamente 0,5 ml) de agua y la solución fue sometida al revelado con acetonitrilo al 92% a 5°C en una columna (1,5x14 cm) de Sephadex LH-20. El eluado fue recogido en fracciones de 300 gotas con la consecuencia de que se extrajo el 85,1% de la sustancia activa en las fracciones 16-38 (244 ml) que fueron concentradas a 0,5 ml aproximadamente bajo presión reducida. El concentrado fue pasado a través de una columna (1x36 cm) de Sephadex G 10 y revelado con agua a 5°C. El eluado fue recogido en fracciones de 50 gotas y las fracciones activas fueron concentradas bajo presión reducida y secadas por congelación. Así pues, la fracción 5 dió 2,5 mg de la sal sódica purificada (3120 u/mg) y la fracción 6 dió 17,05 mg de la sal (5800 u/mg), $ID_{50} = 0,82$ ng). Rendimiento 56,5%.

El procedimiento anterior fue repetido 6 veces - usando 1,412 gr del polvo de sal sódica (980 u/mg). Los polvos que tenían una actividad de 4000 u/mg o superior fueron combinados para dar 118 mg (46,4%) de la sal sódica purificada (actividad media 5463 u/mg).

EJEMPLO 11

118 mg del polvo (5463u/mg) obtenido en el ejemplo 10 fueron cromatografiados nuevamente en una columna (1,2 x 11 cm) de Sephadex LH-20 usando acetonitrilo al 92% como disolvente de revelado. El eluado fue recogido en fracciones de 300 gotas con el resultado de que se extrajo el 74,9% de la sustancia activa en las fracciones 9-33 (262,5 ml). Las fracciones fueron concentradas a 0,3 ml aproximadamente bajo presión reducida y posteriormente cromatografiadas en una co

lumna (1 x 20 cm) de gel de sílice (forma A, Merck Co.) - usando acetonitrilo al 92% como revelador. El eluado fué recogido en fracciones de 300 gotas, resultando en la extracción del 76,5% de la sustancia activa en las fracciones -

5. 9-29 (220 ml), que fueron posteriormente ajustadas a un valor pH de 6,25 y concentradas en 0,5 ml bajo presión reducida. El concentrado fué revelado con agua en una columna - (1 x 36 cm) de Sephadex G-10. El eluado fué recogido en fracciones de 25 gotas y cada una de las fracciones fué ajustada a un valor pH de 6,5, concentrada bajo presión reducida y secada por congelación. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 8.

TABLA 8

15.	Fracción	Peso(mg)	Actividad (u/mg)	ID ₅₀ (ng)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ (nm)	(E _{1%} ^{1cm})
	10	7,4	7,056	0,7	240(335),	280(183)
	11	12,4	9,600	0,5	240(283),	280(193)
	12	12,5	10,528	0,4	240(304),	280(218)
20.	13	6,85	4,680	-	-	-

N O T A

La Patente de Invención que se solicita por veinte años, para España, de acuerdo con la vigente legislación, de berá recaer sobre: "PROCESO PARA LA PRODUCCION DE SUSTANCIA

25. NO 696 - SY 2-A", con Prioridad a la Demanda de Patente en - Japón nº 76557/77 de fecha 29 de Junio de 1977, según las características esenciales de las siguientes:

30.

REIVINDICACIONES

- 1.- Proceso para la producción de sustancia MC 696 - SY 2-A, que consiste en cultivar una cepa de "Streptomyces fulvoviridis" MC 696 - SY 2 (identificada por FERM-P 1504 o
5. ATCC 21954) para producir y acumular la sustancia MC 696 - SY 2-A en el medio de cultivo, y recuperar después esta sustancia del caldo de cultivo que contiene la sustancia MC 696 - SY 2-A mientras es mantenida esta sustancia bajo la forma de una sal de sustancia MC 696 - SY 2-A después de convertir dicha sustancia en la sal en una fase apropiada anterior del
10. proceso de recuperación y purificación.
- 2.- Proceso para la producción de sustancia MC 696 - SY 2-A, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sustancia MC 696 - SY 2-A del caldo de cultivo de la cepa es adsorbida sobre una resina de intercambio aniónico fuertemente
15. básica bajo la forma de su sulfato que es posteriormente eluido con una solución acuosa de cloruro amónico, cloruro sódico o sulfato amónico, y se recupera un producto crudo de la sustancia MC 696 - SY 2-A a partir del eluado así obtenido.
20. 3.- Proceso para la producción de sustancia MC 696 - SY 2-A, de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en cultivar una cepa de "Streptomyces fulvoviridis" MC 696 - SY 2, ajustar el filtrado del caldo de cultivo resultante a un valor pH ligeramente ácido por adición de ácido diluido, tratar el filtrado del caldo de cultivo acidificado con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica bajo la forma de su sulfato para adsorber la sustancia MC 696 - SY 2-A sobre dicha resina, eluir esta resina con una solución acuosa de cloruro amónico, cloruro sódico o sulfato amónico, recoger
25. las fracciones activas que contienen la sustancia MC 696 - SY
- 30.

- 2-A a partir del eluado, tratar las fracciones activas con carbón activo para adsorber la sustancia deseada sobre el mismo, extraer esta resina activa con acetona acuosa, tratar el extracto de acetona acuosa obtenido con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de su sal de bario para convertir la sustancia MC 696 - SY 2-A en su sal de bario, concentrar el extracto de acetona que contiene dicha sal de bario de sustancia MC 696 - SY 2-A hasta la sequedad para dar un polvo crudo de la sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A, disolver dicho polvo crudo en agua, pasar la solución acuosa resultante a través de una columna de una resina adsorbente porosa no iónica para adsorber la sal de bario sobre la misma, eluir la resina adsorbente con agua desionizada para recoger las fracciones activas del eluado, tratar las fracciones activas con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de su sal de bario, seguido de la concentración hasta la sequedad para dar un polvo crudo secundario de sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A, pasar una solución de este polvo crudo secundario en acetona acuosa a través de una columna de silicato de magnesio activado, seguido de la elución con acetona acuosa para recoger las fracciones activas del eluado, añadiendo a las fracciones activas una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de la sal de bario, seguido de la filtración y concentración del filtrado hasta la sequedad para dar un polvo crudo terciario de sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A, mezclar una solución de este polvo crudo terciario en agua con un agente tampón de fosfato (pH 7,0), revelar la mezcla resultante en una columna de un tamiz molecular celulósico, recoger el efluente en

- fracciones, concentrar las fracciones activas, revelar la solución concentrada resultante en una columna de una resina adsorbente porosa no iónica con agua desionizada, recoger las fracciones activas del efluente, seguido del tratamiento
5. con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de la sal de bario y la concentración de las fracciones activas, cromatografiando la solución concentrada resultante en una columna de un tamiz molecular fabricado con un derivado del dextrano, recoger las fracciones activas
10. del efluente a partir de la columna de tamiz molecular, seguido del tratamiento con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de la sal de bario para obtener una solución de una sal de bario purificada de la sustancia MC 696 - SY 2-A, deshidratando esta solución para
15. dar un polvo blanco y puro de la sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A.

- 4.- Proceso para la producción de sustancia MC 696 - SY 2-A, de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en cultivar una cepa de "Streptomyces fulvoviridis" MC 696 - SY
20. 2, ajustar el filtrado del caldo de cultivo resultante a un valor pH ligeramente ácido por adición de ácido diluido, tratar el filtrado del caldo de cultivo acidificado con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica bajo la forma de su sulfato para adsorber la sustancia MC 696 - SY 2-A
25. sobre dicha resina, eluir esta resina con una solución acuosa de cloruro amónico, cloruro sódico o sulfato amónico, recoger las fracciones activas que contienen la sustancia MC 696 - SY 2-A a partir del eluado, tratar las fracciones activas con carbón activo para adsorber la sustancia deseada sobre el mismo, extraer esta resina activa con acetona acuosa,
- 30.

- tratar el extracto de acetona acuosa obtenido con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de su sal de bario para convertir la sustancia MC 696 - SY 2-A en su sal de bario, concentrar el extracto de acetona que contiene dicha sal de bario de sustancia MC 696 - SY 2-A hasta la sequedad para dar un polvo crudo de la sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A, disolver dicho polvo crudo en agua, pasar la solución acuosa resultante a través de una columna de resina adsorbente porosa no iónica para adsorber la sal de bario sobre la misma, eluir la resina adsorbente con agua desionizada para recoger las fracciones activas del eluado, tratar las fracciones activas con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de su sal de bario, seguido de la concentración hasta la sequedad para dar un polvo crudo secundario de sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A, disolver este polvo crudo secundario en metanol acuoso, revelar la solución metanólica resultante en una columna de un tamiz molecular fabricado con un derivado dextránico empleando metanol acuoso como disolvente de revelado, recoger las fracciones activas del efluente, tratar dichas fracciones activas con una resina de intercambio aniónico fuertemente ácida bajo la forma de su sal de bario, deshidratar las fracciones activas así tratadas para dar un polvo crudo de la sal de bario de sustancia MC 696 - SY 2-A, disolviendo después este polvo crudo en acetona acuosa, pasar la solución de este polvo crudo en acetona acuosa a través de una columna de silicato de magnesio activado, seguido de la elución con acetona acuosa para recoger las fracciones activas del eluado, añadir a las fracciones activas una resina

- na de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de sal de bario, seguido de la filtración y concentración del filtrado hasta la sequedad para dar un polvo crudo de la sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A, mezclar
5. una solución de este polvo crudo en agua con un agente tampón de fosfato (pH 7,0), revelar la mezcla resultante en una columna de un tamiz molecular celulósico, recoger el efluente en fracciones, concentrar las fracciones activas, revelar la solución concentrada resultante en una columna
 10. de una resina adsorbente porosa no iónica con agua desionizada, recoger las fracciones activas del efluente, seguido del tratamiento con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de la sal de bario y la concentración de las fracciones activas, cromatografiando la solución concentrada resultante en una columna de un tamiz molecular fabricado con un derivado del dextrano, recoger las fracciones activas del efluente a partir de la columna de tamiz molecular, seguido del tratamiento con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de
 20. la sal de bario para obtener una solución de una sal de bario purificada de la sustancia MC 696 - SY 2-A, deshidratando esta solución para dar un polvo blanco y puro de la sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A.

- 5.- Proceso para la producción de sustancia MC 696
25. - SY 2-A, de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en cultivar una cepa de "Streptomyces fulvoviridis" MC 696 - SY 2, ajustar el filtrado del caldo de cultivo resultante a un valor pH ligeramente ácido por adición de ácido diluido, tratar el filtrado del caldo de cultivo acidificado con
 30. una resina de intercambio aniónico fuertemente básica bajo

- la forma de su sulfato para adsorber la sustancia MC 696 - SY 2-A sobre dicha resina, eluir esta resina con una solución acuosa de cloruro amónico, cloruro sódico o sulfato amónico, recoger las fracciones activas que contienen la sustancia MC 696 - SY 2-A a partir del eluado, tratar las fracciones activas con carbón activo para adsorber la sustancia deseada sobre el mismo, extraer esta resina activa con acetona acuosa, tratar el extracto de acetona acuosa obtenido con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de su sal de bario para convertir la sustancia MC 696 - SY 2-A en su sal de bario, concentrar el extracto de acetona que contiene dicha sal de bario de sustancia MC 696 - SY 2-A hasta la sequedad para dar un polvo crudo de la sal de bario de sustancia MC 696 - SY 2-A, disolver dicho polvo crudo en agua, pasar la solución acuosa resultante a través de una columna de una resina adsorbente porosa no iónica para adsorber la sal de bario sobre la misma, eluir la resina adsorbente con agua desionizada para recoger las fracciones activas del eluado, tratar las fracciones activas con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de su sal de bario, seguido de la concentración hasta la sequedad para dar un polvo crudo secundario de sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A, pasar una solución de este polvo crudo secundario en acetona acuosa a través de una columna de silicato de magnesio activado, seguido de la elución con acetona acuosa para recoger las fracciones activas a partir del eluado, añadir a las fracciones activas una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de su sal de bario, seguido de la filtración y concentración del filtrado hasta la sequedad -
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.

- para dar un polvo crudo terciario de la sal de bario de sustancia MC 696 - SY 2-A, revelar una solución de dicho polvo crudo terciario en acetona acuosa en una columna de silicato magnesio activado usando acetona acuosa como disolvente
5. de revelado, recoger las fracciones activas del efluente y tratar después dichas fracciones activas con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de su sal de bario, concentrar las fracciones activas así tratadas, revelar la solución concentrada así obtenida en una columna de un tamiz molecular fabricado con un derivado dextránico usando agua desionizada como disolvente de revelado,
10. recoger las fracciones activas del efluente a partir de la columna de tamiz molecular, seguido del tratamiento con una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida bajo la forma de su sal de bario para obtener una solución de una sal de bario purificada de la sustancia MC 696 - SY 2-A, deshidratando esta solución para dar un polvo blanco y puro de la sal de bario de la sustancia MC 696 - SY 2-A.

- 6.- "PROCESO PARA LA PRODUCCION DE SUSTANCIA MC
20. 696 - SY 2-A"

Según queda sustancialmente descrito en la pre

... / ...

sente memoria que consta de treinta y seis hojas escritas a máquina, por una sola cara y acompañada de dibujos.

Madrid, 23 JUN. 1978

ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU

KAGAKU KENKYU KAI

P.P.

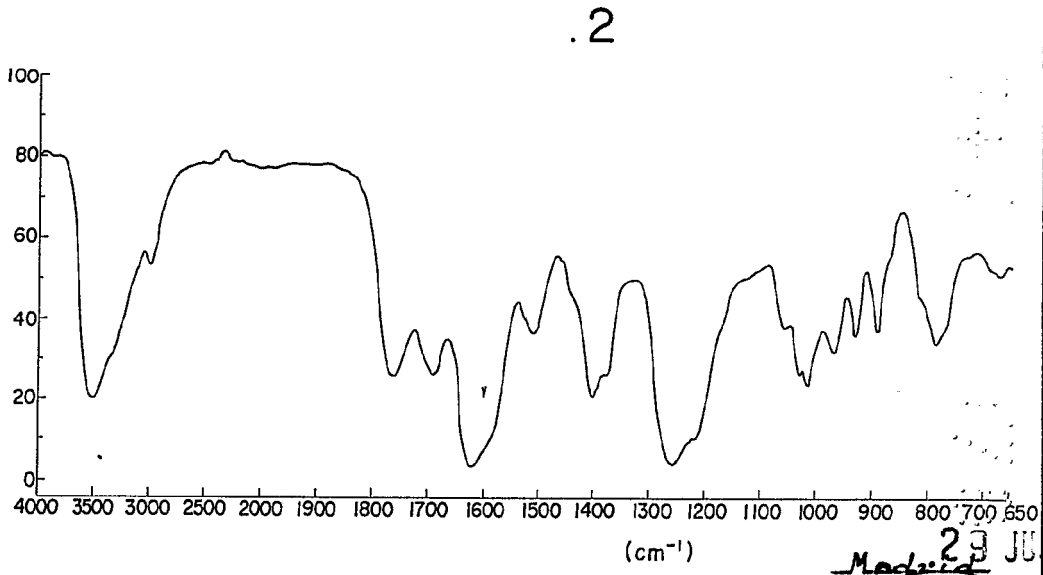
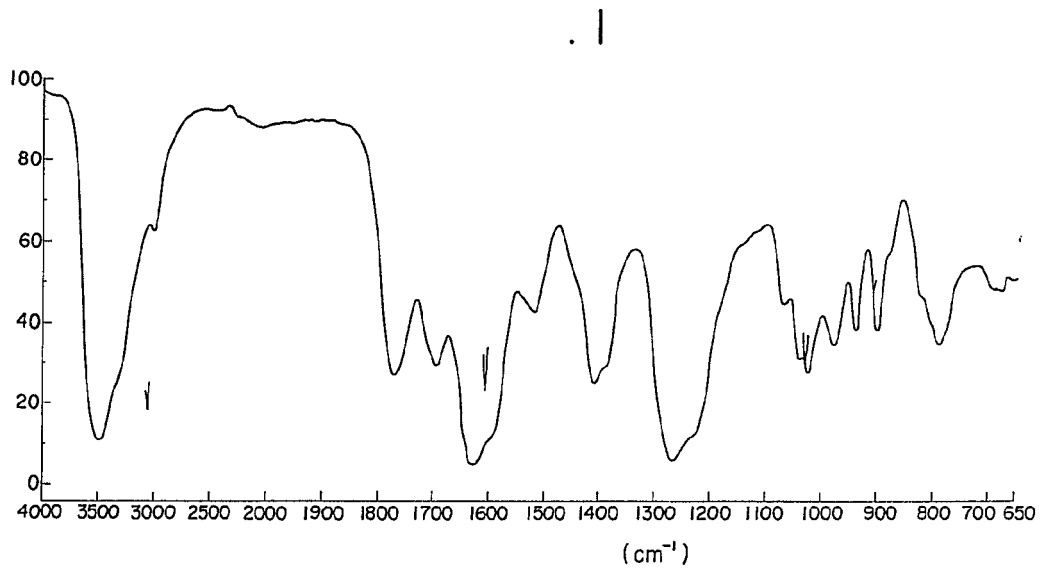
FRANCISCO GARCIA CABREIZO

P.P.

Firmado: M. Dolores Jorquera

5.

471250



Madrid 23 JUL. 1978

P.P.
FRANCISCO GARCIA C⁴B ERIZO
P.P.

[Handwritten signature]
Firmado: M. Dolores Jorquera