

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 275**

51 Int. Cl.:

C12P 1/02 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06704767 .0**

96 Fecha de presentación: **31.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1866423**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **Fabricación de productos metabólicos microbianos secundarios, altamente marcados con isótopos, así como productos metabólicos correspondientes**

30 Prioridad:
05.04.2005 AT 5742005

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2012

73 Titular/es:
**ERBER AKTIENGESELLSCHAFT
INDUSTRIESTRASSE 21
3130 HERZOGENBURG, AT**

72 Inventor/es:
**FREUDENSCHUSS, Martin;
HÄUBL, Georg;
KRSKA, Rudolf;
JAUNECKER, Günther y
BINDER, Eva**

74 Agente/Representante:
de Elizaburu Márquez, Alberto

ES 2 381 275 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fabricación de productos metabólicos microbianos secundarios, altamente marcados con isótopos, así como productos metabólicos correspondientes

5 La invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de productos metabólicos secundarios, marcados con isótopos, de hongos o bacterias, en un medio sintético líquido de cultivo, así como a productos metabólicos secundarios, marcados con isótopos, seleccionados del grupo de las micotoxinas, toxinas o antibióticos.

10 Las sustancias marcadas con isótopos tienen en la actualidad cada vez mayor importancia, en especial en la tecnología de la cromatografía de líquidos con detección espectrométrica de masas (LCMS), en la que se hace posible un análisis espectrométrico eficiente con elevado paso de producto. La tecnología se puede emplear para una gran multitud de analitos potenciales, no habiendo ninguna limitación de la masa molecular, no obstante, pudiendo presentarse problemas en la comprobación de las sustancias individuales, partiendo de que tanto los espectros de desintegración, como también los picos moleculares individuales, se tienen que coordinar adecuadamente. Para obtener aquí una aplicación y métodos fiables de LCMS, es de importancia creciente la utilización de las llamadas sustancias internas de referencia. Sustancias internas de referencia son sustancias que presentan una muy elevada similitud con el analito objetivo propiamente dicho, es decir, en especial cuando en lo posible presenten una estructura molecular idéntica, aunque con peso molecular diferente. Como ideales sustancias internas de referencia se muestran pues moléculas marcadas con isótopos del analito objetivo, es decir, en las que uno o varios átomos en la molécula, se sustituyen por sus isótopos. Actualmente se fabrican tales sustancias por síntesis orgánica, sustituyéndose, por ejemplo, hidrógenos o carbonos por los correspondientes isótopos más pesados.

20 A este respecto, en análisis LCMS se ha mostrado, no obstante, que es deseable que las sustancias marcadas con isótopos, que se utilizan como sustancias internas de referencia, posean una diferencia de masa molecular de al menos 3, para poder obtener una separación clara del analito objetivo, y que cuando sea posible, se deben de llegar a emplear sustancias que se compongan de los menos isotopómeros que sea posible.

25 Una manera de fabricar metabolitos vegetales o microbianos, marcados con isótopos, es mediante el proceso de biosíntesis de las correspondientes plantas y/o microbios. Aquí se mezclan los medios de cultivo con sustancias nutritivas marcadas radiactivamente, y los componentes nutritivos del medio se incorporan en un cierto porcentaje, en los ciclos anabólicos y metabólicos de los cultivos microbianos o vegetales, de manera que los isótopos se incorporan a los productos metabólicos. Un inconveniente de este procedimiento es que, con este procedimiento únicamente se puede obtener un marcado incompleto, y normalmente se forma una mezcla de los más distintos isotopómeros, con lo que la utilización de tales sustancias marcadas con isótopos, o metabolitos vegetales o microbianos marcados con isótopos, para el empleo como sustancias internas de referencia, parece muy poco apropiada, puesto que al emplear tales sustancias, no se aplicaría una sustancia de referencia, sino una amplia paleta de isotopómeros, con lo que una comprobación acertada de sustancias objetivos en espectrometrías LCMS, de nuevo no parece posible, o sólo lo es con extraordinaria dificultad.

35 De la cita bibliográfica Wu y otros, *Bioquímica analítica* 336 (2005), páginas 164-171, se puede deducir ya un procedimiento para el análisis cuantitativo de los metabolitos microbianos, utilizando una mezcla de metabolitos marcados con ^{13}C uniforme y completamente, como sustancias internas de referencia, en el procedimiento de extracción de metabolitos y subsiguiente análisis LC-ESI-MS/MS [Cromatografía de Líquidos – ElectroSpray Ion / espectrometría de masas], habiéndose cultivado los metabolitos de ^{13}C completos, procedentes de *Saccharomyces cerevisiae*.

40 De la cita bibliográfica Evans y otros, *Bioquímica analítica* 306, páginas 197-203 (2002), se puede deducir ya un procedimiento de análisis LC/MS de la biosíntesis NAD [Dinucleótido de Nicotinamida Adenina], utilizando precursores estables de piridina marcados con isótopos. En este procedimiento se emplea una sustancia interna de referencia, derivada de levadura, que está marcada completamente con relación a los átomos ^{13}C y ^{15}N .

45 Por Kurzatkowski y otros, *Biotechnología aplicada a la microbiología* (1984) 19, páginas 312-315, se ha dado a conocer la fabricación de penicilina G marcada radioactiva, mediante micelios inmovilizados de hongos, con el fin de medir la actividad eficaz en la fabricación de penicilina G radioactiva, a partir de valina- ^{14}C .

50 Además, de Carson y otros, *Can. J. Microbiol.* 43:97-101 (1997), se puede deducir la biodegradación de N-fosfonometiliminodiácido acético, mediante microorganismos a partir de lodo industrial activado, representando el componente clave en este procedimiento de desintegración, el glifosato, que se marcó con ^{14}C , para poder seguir el proceso de desintegración.

55 Del documento Blackwell B A y otros: "Estudio NMR [Resonancia Magnética Nuclear] de carbono-13, de la biosíntesis de toxinas por *Fusarium-graminearum*", 1985, *Diario de química biológica*, tomo 260, nº 7, página(s) 4243-4247, se puede deducir un estudio de NMR de ^{13}C de la biosíntesis de toxinas por *Fusarium Graminearum*. Aquí se investigaron estudios de NMR de ^{13}C referentes a la biosíntesis de micotoxinas, que se forman por *Fusarium Graminearum*, mediante la incorporación de precursores de acetato de [$1\text{-}^{13}\text{C}$] y [$2\text{-}^{13}\text{C}$].

Del documento Lindenmeier M y otros, Diario de cromatografía, Elsevier Science Publiciaten B.V., Amsterdam NL, tomo 1023, nº 1, 9 de enero de 2004, páginas 47-56, se puede deducir una cuantificación de ocratoxina A en medios nutritivos, mediante un ensayo estable de dilución de isótopos, utilizando HPLC [cromatografía de líquidos de alta eficacia], espectrometría de masas en tándem con cromatografía. En este estudio se desarrolló un ensayo de dilución de isótopos para la cuantificación de la micotoxina ocratoxina A, utilizando [²H₅]-OTA como sustancia interna de referencia.

La presente invención tiene como meta poner a disposición un procedimiento para la fabricación de productos metabólicos secundarios, marcados con isótopos, de hongos o bacterias, en los que todos o casi todos los átomos de carbono, átomos de nitrógeno o átomos de azufre en el producto de partida, se sustituyen por isótopos estables, y de este modo se obtiene un único producto final único, marcado con isótopos, el cual se puede comprobar fácilmente y con seguridad en procedimientos espectrométricos, en especial LCMS. La invención tiene, además, como meta la fabricación de un producto metabólico que se pueda emplear o utilizar con seguridad y eficacia, como sustancia interna de referencia, o en procedimientos espectrométricos de análisis, en especial LCMS.

Para la solución de estas misiones, el procedimiento según la presente invención se conduce de manera que la síntesis se realice mediante inmovilización de los hongos o bacterias en un soporte inerte, con adición de un medio de cultivo sintético líquido en el que al menos el 95 % de los átomos de carbono, de los átomos de nitrógeno y/o de los átomos de azufre se hayan sustituido por isótopos estables. Haciendo que la síntesis se realice mediante inmovilización de los hongos o bacterias en un soporte inerte, con adición de un medio de cultivo sintético líquido en el que, en lo esencial, la totalidad o al menos el 95 % de los átomos de carbono, de los átomos de nitrógeno y/o de los átomos de azufre se hayan sustituido por isótopos estables, se logra fabricar un producto metabólico de los hongos y bacterias, marcado con isótopos, en el que la totalidad de los átomos, o al menos el 95 % de los átomos que por cultivo se pueden sacar del medio de cultivo, a saber, átomos de carbono, de nitrógeno o de azufre, están sustituidos por los isótopos estables de las sustancias nutritivas marcadas con isótopos, contenidas en el medio de cultivo y, por tanto, se puede obtener un producto preciso marcado con isótopos, y no, como tantas veces se ha descrito en el estado actual de la técnica, una mezcla de distintos homólogos con número variable de átomos de isótopos. Mediante este procedimiento de fabricación, se puede obtener pues un producto metabólico secundario, marcado con isótopos, que se puede emplear con precisión, y que se puede comprobar clara e inequívocamente en todos los análisis, o también en estudios metabólicos.

Según un perfeccionamiento, se conduce el procedimiento de manera que se emplean como fuentes de carbono, azúcares o alcoholes sacáridos en el medio sintético líquido de cultivo, en especial glucosa D- [U-¹³C₆], sacarosa ¹³C, glicerina ¹³C y/o acetato ¹³C, como fuentes de nitrógeno, aminoácidos, nitratos compuestos de amonio o urea ¹⁵N, como fuentes de azufre, sulfatos, sulfuros o aminoácidos ³³S o ³⁴S. Estando contenidos en el medio sintético líquido de cultivo, fuentes completamente marcadas de carbono, nitrógeno y/o azufre, durante el cultivo de productos metabólicos de hongos o bacterias, el hongo o la bacteria esté obligada a incorporar el respectivo isótopo marcado, al producto metabólico, de manera que se puede asegurar que los productos metabólicos secundarios de los hongos o bacterias están marcados en un alto grado, si no completamente, con los correspondientes isótopos, o están sustituidos por los correspondientes isótopos.

Para mejorar el rendimiento en productos metabólicos secundarios marcados con isótopos, de hongos o bacterias, según un perfeccionamiento se conduce el procedimiento de manera que el medio sintético líquido de cultivo contiene adicionalmente una mezcla seleccionada de sales inorgánicas o ácidos y bases, con los iones Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, B⁺⁺⁺, así como CO₃⁻, SO₄⁻, PO₄⁻, NO₃⁻. Estando contenidos en el medio sintético líquido de cultivo, sales o ácidos y bases con los iones Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, B⁺⁺⁺, así como CO₃⁻, SO₄⁻, PO₄⁻, NO₃⁻, se asegura que la totalidad de los otros iones que posiblemente están contenidos en los hongos o bacterias, junto al carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre, están puestos a disposición en cantidad suficiente y con seguridad, con lo que junto a un cultivo rápido, se puede lograr también un rendimiento elevado.

Para la ulterior mejora del rendimiento, se emplea como soporte inerte, un soporte natural o sintético con gran superficie interna, en especial silicato, silicato laminado, zeolita, bentonita, arcilla cocida, tierra de diatomeas, plásticos o similares. Gracias al empleo de un soporte inerte con gran superficie interna, se logra obtener una mejora de rendimiento en el procedimiento según la presente invención, de al menos el 50 %, respecto a procedimientos convencionales que se realizan sin soporte inerte con gran superficie interna. Semejantes aumentos de rendimiento hacen el procedimiento, no sólo más económico, sino también aseguran que se pueden fabricar cantidades suficientes de los deseados productos finales de los productos metabólicos secundarios, marcados con isótopos, para poder emplear estos prácticamente en análisis, como sustancias internas de referencia, o también en estudios metabólicos.

Las mayores mejoras del rendimiento, se pueden lograr según la invención, en especial, haciendo que como soporte inerte con gran superficie interna, se emplee un silicato de aluminio, por ejemplo, tierra de diatomeas, en especial kieselgur, isolute HM-N [tierra especial de diatomeas para extracción líquido-líquido], o una zeolita o un silicato laminado, en especial una vermiculita del grupo de los minerales de mica, en forma natural o tratada. En el caso de estas sustancias es apropiada, en especial, la calidad de la superficie, como tensión superficial, porosidad y similares, para una conversión especialmente buena en la superficie del soporte. En forma análoga, mediante la utilización de soportes inertes de plástico que se pueden elegir de material esponjado, poliamida, silicona, polietileno

leno, polipropileno, politetrafluoroetileno, poliéster o similar, se pueden lograr mejoras correspondientes de rendimiento, produciendo en igual forma rendimientos mejorados, el empleo de soportes naturales con gran superficie interna, o el empleo de soportes de plástico, en función de los productos metabólicos a producir.

5 Para una conducción lo más rápida posible del procedimiento, al mismo tiempo con mayor rendimiento, se ha perfeccionado la invención partiendo de que la fabricación se realice a temperaturas entre 3 y 45 °C, en especial entre 10 y 35 °C. A este respecto se ha comprobado en parte como favorable que un procedimiento de fabricación no siempre se conduce a temperatura constante, sino que se pueden conducir también cambios de temperatura dentro de los límites indicados para mejoras de rendimiento o aceleración de las reacciones o transformaciones.

10 Para conseguir un producto final lo más puro posible, se conduce el procedimiento según la invención de manera que los productos metabólicos secundarios, marcados con isótopos, se obtengan del medio sintético líquido mediante extracción y concentración, por ejemplo, por la combinación de etapas como extracción sólido/líquido - líquido/líquido, centrifugación, filtración, evaporación, concentración y vaporización. Después de la obtención de los productos metabólicos secundarios, marcados con isótopos, se ha comprobado como ventajoso someter estos productos a una limpieza ulterior, empleándose según la invención en forma preferente, como procedimientos de limpieza, procedimientos cromatográficos, en especial, cromatografía en columna, cromatografía preparatoria de capa fina, cromatografía iónica, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión y/o cromatografía preparatoria de líquidos de alto rendimiento. Según un procedimiento semejante de elaboración y método de limpieza, se logra obtener productos metabólicos secundarios, marcados con isótopos, de hongos y bacterias, en los que al menos el 95 % de los átomos de carbono, de los átomos de nitrógeno y/o de los átomos de azufre, se han sustituido por los correspondientes isótopos estables y, por tanto, se pueden obtener productos que presenten una diferencia correspondiente de masa, respecto al analito natural para, por ejemplo, en una cromatografía de líquidos con detección espectrométrica de masas (LCMS), poderlos diferenciar suficientemente de isótopos pesados que se presentan naturalmente y, por tanto, poner a disposición en tales análisis, por ejemplo, una sustancia interna de referencia, estable, claramente identificable.

25 La invención tiene, además, como meta un producto metabólico secundario, marcado con isótopos, seleccionado del grupo de micotoxinas o antibióticos, que en lo esencial presente completamente, en especial al menos el 95 % de todos los átomos de carbono, de nitrógeno y/o de azufre, sustituidos por isótopos estables.

30 Semejantes productos metabólicos secundarios, marcados con isótopos en los que al menos el 95 % de los átomos de carbono, de nitrógeno y/o de azufre se han sustituidos por isótopos estables correspondientes, seleccionado del grupo de micotoxinas o antibióticos, según un perfeccionamiento de la invención, se pueden emplear como sustancias internas de referencia en la analítica, para estudios de metabolismo en ensayos de alimentación para el ganado, para estudios metabólicos, para el esclarecimiento de ciclos de metabolismo, formas de degradación y/o períodos de degradación, así como almacenamientos. En la totalidad de los fines de empleo citados es de esencial importancia haber incluido en el esquema del ensayo o en el esquema de la degradación, una sustancia de referencia estable y claramente identificable, o una sustancia claramente identificable y perseguible, para poder comprender claramente las etapas individuales del procedimiento o del ciclo.

40 Según un perfeccionamiento, en los procedimientos analíticos o en los estudios metabólicos, formas de degradación y similares, se emplean como micotoxinas, tricotesenos, como nivalenol, deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol, 15-acetil-deoxinivalenol, fusarenona X, T-2 toxina, HT-2 toxina, DAS, fumonisinas como fumonisina B1, B2 ó B3, ocratoxina A, B, C o D, zearalenonas, moniliformina o aflatoxinas como aflatoxina B1, B2, G1 ó G2. Las micotoxinas son de importancia siempre creciente en la etiología de enfermedades de los animales, y es necesario fabricar técnicamente cantidades suficientes de tales sustancias, para con sustancias químicas lo más inequívocas o puras que sea posible, poder realizar en consecuencia las correspondientes investigaciones toxicológicas de medicina veterinaria. Puesto que las micotoxinas representan una seria amenaza para la salud de animales y hombres, su analítica es un tema de interés global, puesto que muchos países han desarrollado ya en especial, valores orientativos y límite para la tolerancia de tales sustancias. La comprobación o la cuantificación de semejantes toxinas mediante el empleo de sustancias internas de referencia que se puedan comprobar inequívocamente y que permitan, por tanto, un análisis cuantitativo de la respectiva toxina, pone a disposición un progreso significativo en la comprobación de tales sustancias peligrosas.

50 De igual manera, cada vez tiene mayor importancia el empleo de antibióticos como los antibióticos formados por actinomicetos, como la tetraciclina, estreptomycinina o aminoglucósidos, antibióticos formados especialmente por bacilos, como bacitracina o polimixina, antibióticos formados por penicillium, como penicilina o griseofulvina, o cefalosporina formada por cefalosporium, en especial en el caso de enfermedades o en el caso de una comprobación de tales sustancias en medios nutritivos y estimulantes, teniendo que constatar también para estas sustancias, que
55 sustancias con las que se logra una comprobación cuantitativa de los productos metabólicos, como los antibióticos, son de vital interés para la generalidad.

Según un perfeccionamiento, se llegan a aplicar como productos metabólicos, sustancias puras con un grado de marcado de ^{13}C , ^{15}N ó ^{33}S ó ^{34}S , con lo que, por una parte es posible una diferenciación clara de las sustancias o productos metabólicos no marcados y, por otra parte, se garantiza también con seguridad una diferenciación de

isótopos existentes naturalmente y, por último, en análisis o procedimientos de comprobación, se puede poner a disposición una sustancia que se puede seguir inequívocamente.

La invención se explica a continuación en detalle, de la mano de ejemplos que muestran la fabricación de productos metabólicos altamente enriquecidos con isótopos.

5 Ejemplo 1

Fabricación de deoxinivalenol [U-¹³C₁₅] (DON) altamente enriquecido con isótopos

Para la fabricación de ¹³C-DON marcado completamente, se inocula un hongo Fusarium, concretamente Fusarium Graminearum, en un material soporte inerte, concretamente vermiculita, y se incuba en un medio sintético de cultivo compuesto de 0,5 g de K₂HPO₄, 2,0 g de NaNO₃, 0,7 g de MgSO₄·7H₂O, 2,0 g KCl, 15 g de glucosa D-[U-¹³C₆], 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄·7H₂O ó 20 mg de ZnSO₄·7H₂O, que contiene la glucosa D-[U-¹³C₆] como única fuente de carbono. Después de 5 semanas a unos 28 °C se extrae el material que contiene la toxina, con acetato de etilo, y a continuación se limpia a la calidad de referencia (pureza > 98 %) mediante extracción, cromatografía y cristalización.

Por cada carga de producción se preparan unos 40 ml de carga de incubación. El material agrupado que contiene la toxina se transforma seguidamente. De 1000 ml de carga se obtienen entre 5 y 50 mg [7,5 a 17,5 mg] de DON-[U-¹³C₁₅] completamente marcado.

El producto limpiado se caracterizó mediante los siguientes procedimientos de análisis:

¹H NMR y ¹³C-NMR

LC-MS/MS Q Trap [espectrómetro lineal de trampa de iones] para la determinación de la porción del isótopo ¹³C
Determinación de la pureza y de la concentración con respecto a materiales de referencia con UV/VIS [ultravioleta/visible] y HPLC-DAD

Ajuste de la concentración

Controles de calidad con UV/VIS, HPLC-DAD, LC-MS/S Q Trap

Un deoxinivalenol-¹³C₁₅ (DON-¹³C₁₅) semejante altamente enriquecido con isótopos, se puede emplear, por ejemplo, como sustancia interna de referencia. Una sustancia interna de referencia de tal tipo, tiene una masa molar exactamente de unos 15 g/mol más pesada, y por tanto, su señal aparece en el espectro de masas (figura 1), exactamente 15 amu [unidad de masa atómica] más alta que la señal del analito. Puesto que todas las demás características químicas y físicas del DON marcado con ¹³C son idénticas con el analito, una sustancia interna de referencia semejante, contrae exactamente la misma fragmentación que el analito, también la ionización de la sustancia es igual y, por tanto, también el volumen de ionización. Esto quiere decir que la altura de la señal de los fragmentos o de los iones de la sustancia, entre sustancia interna de referencia y analito, son absolutamente comparables y, puesto que se conoce la concentración de la sustancia interna de referencia en un análisis, de este modo se pueden sacar conclusiones directas sobre la concentración de un analito, por lo que un deoxinivalenol semejante altamente enriquecido, representa una sustancia interna de referencia, casi ideal.

La figura 1 muestra DON-C₁₂ y DON-C₁₃ en un espectro común de masas. En la figura 1 se muestra junto al pico molecular de DON-¹³C₁₅ y al de DON-¹²C para 295,2 ó 310,2, también la distribución de los compuestos en los que no se marcaron todos los átomos de C y, por tanto, no se componen de un solo tipo de isótopos (isotopómeros). En el caso del deoxinivalenol de origen natural, este es el DON-¹³C₁ que corresponde a la distribución natural entre C₁₂ y C₁₃.

40 Ejemplo 2

Fabricación de fumonisina-[¹³C] altamente enriquecida con isótopos

Para la fabricación de una fumonisina completamente marcada con ¹³C, se aplican 1000 ml de medio líquido, compuesto de 0,5 g de KH₂PO₄, 0,5 g de KNO₃, 0,7 g de MgSO₄·7H₂O, 2,0 g de KCl, 17,5 g de glucosa D-[U-¹³C₆], 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄·7H₂O y 20 mg de ZnSO₄·7H₂O, con glucosa D-[U-¹³C₆] como única fuente de carbono, sobre un dado de material esponjado de 1 x 1 x 1 cm de tamaño, se inocula con Fusarium moniliforme, y se incuba a 28 °C y 70 % de humedad relativa del aire, en la estufa incubadora. Después de 3 semanas se extrae el material que contiene la toxina con una mezcla de disolventes de 1:1 acetonitrilo : H₂O y, a continuación se limpia a la calidad de referencia (pureza > 98 %) mediante extracción y etapas de cromatografía, como cromatografía por intercambio de iones, cromatografía instantánea en columna con gel de sílice, cromatografía de capa fina, y HPLC preparatoria.

Por cada 1000 ml de carga se obtienen así 80 – 240 mg en fumonisinas-¹³C (HPLC-FLD) [HPLC con derivación fluorescente].

Ejemplo 3

Fabricación de 3-acetil-deoxinivalenol-[U-¹³C₁₇] altamente enriquecido con isótopos

Para la fabricación de 3-acetil-deoxinivalenol-[U-¹³C₁₇] altamente enriquecido con isótopos, se aplican 1000 ml de medio líquido sintético, compuesto de 0,5 g de KH₂PO₄, 0,5 g de KNO₃, 0,7 g de MgSO₄·7H₂O, 2,0 g de KCl, 17,5

g de glucosa D-[U-¹³C₆], 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄*7H₂O y 20 mg de ZnSO₄*7H₂O, que contiene glucosa D-[U-¹³C₆] marcada completamente con isótopos, como única fuente de carbono, sobre una tierra de diatomeas, concretamente isolate HM-N, se inocula con *Fusarium Graminearum*, y se incuba a 28 °C durante 9 días en la estufa incubadora. Después de 9 días se recoge el material que contiene la toxina, se extrae con acetonitrilo/H₂O azeótropo, y a continuación se limpia a la calidad de referencia (pureza > 98 %) mediante extracción, cromatografía, cristalización, MPLC de Büchi y recristalización. De una carga se pueden obtener unos 15 – 50 mg de producto final de gran pureza. El control de la pureza se llevó a cabo mediante análisis LC-UV con una columna capilar C18.

Un 3-acetil-deoxinivalenol marcado con isótopos, fabricado de tal modo, tiene una masa molecular 17 g/mol más pesada, respecto al 3-acetil-deoxinivalenol no marcado. El 3-acetil-deoxinivalenol no marcado tiene una masa molecular de M/z = 338, y el producto totalmente marcado con isótopos, tiene una masa molecular de 355. La figura 2 muestra el espectro de masas del acetil-deoxinivalenol-¹³C, en el cual se reconoce que se ha llegado a un marcado del producto del 75 %, y se puede reconocer la distribución de isótopos del producto. La distribución del producto y de los isotopómeros no marcados completamente, es función en este caso de la pureza de los isótopos del producto de partida, glucosa-¹³C₆, y en el empleo de glucosa-¹³C₆ completamente pura, se puede desplazar todavía claramente en la dirección de producto totalmente marcado. No obstante, por la figura 2 se reconoce claramente que los isotopómeros que poseen menos de 13 átomos de ¹³C, es como si no existiese ya, de manera que también el 3-acetil-deoxinivalenol-¹³C se puede emplear muy bien como sustancia interna de referencia.

Ejemplo 4

Fabricación de 15-acetil-deoxinivalenol-[U-¹³C₁₇] altamente enriquecido con isótopos

Para la fabricación de 15-acetil-deoxinivalenol-[U-¹³C₁₇] altamente enriquecido con isótopos, se inocula con *Fusarium Graminearum* un medio de cultivo, compuesto de 0,5 g de KH₂PO₄, 2,0 g de NaNO₃, 0,7 g de MgSO₄*7H₂O, 2,0 g de KCl, 17,5 g de glucosa D-[U-¹³C₆], 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄*7H₂O y 20 mg de ZnSO₄*7H₂O, sobre un soporte de filosilicato de grano grueso, y se incuba a 28 °C en la estufa incubadora. Después de 9 días se recoge el material que contiene la toxina, se extrae con acetato de etilo, y a continuación se limpia a la calidad de referencia (pureza > 98 %) mediante extracción, cromatografía y cristalización. Alternativamente a la cristalización, también se puede emplear otra etapa de limpieza mediante HPLC preparatorio.

De una carga de fermentación se pueden obtener unos 30 – 60 mg de producto objetivo de gran pureza.

Ejemplo 5

Fabricación de nivalenol-[U-¹³C₁₅] altamente enriquecido con isótopos, o fusarenona X [U-¹³C₁₇]

Para la fabricación de nivalenol-[U-¹³C₁₅] altamente enriquecido con isótopos, o de fusarenona X [U-¹³C₁₇], se inocula con *Fusarium nivale* un medio líquido, compuesto de 0,5 g de KH₂PO₄, 2,0 g de NaNO₃, 0,7 g de MgSO₄*7H₂O, 2,0 g de KCl, 17,5 g de glucosa D-[U-¹³C₆], 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄*7H₂O ó 20 mg de ZnSO₄*7H₂O, con glucosa D-[U-¹³C₆] como única fuente de carbono, y filosilicato inerte, y se incuba a 28 °C durante 5 semanas. Después, el material que contiene la toxina, se extrae con metanol y cloruro de metileno, y a continuación se limpia a la calidad de referencia (pureza > 98 %) mediante extracción, cromatografía y cristalización. Alternativamente a la cristalización, también se puede emplear otra etapa de limpieza mediante HPLC preparatorio.

Ejemplo 6

Fabricación de ocratoxina A-[U-¹³C₂₀] altamente enriquecida con isótopos

Para la obtención de la sustancia objetivo se fermenta el hongo *Petromyces albertensis* sobre un soporte inerte de filosilicato, con un medio líquido sintético, compuesto de 0,5 g de KH₂PO₄, 2,0 g de NaNO₃, 0,7 g de MgSO₄*7H₂O, 2,0 g de KCl, 15 g de glucosa D-[U-¹³C₆], 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄*7H₂O ó 20 mg de ZnSO₄*7H₂O, que contiene glucosa marcada completamente con ¹³C, como única fuente de carbono. Los matraces se incuban a continuación en la estufa incubadora 6 semanas, a 28 °C y 70 % de humedad atmosférica, y a continuación se extraen con tolueno. Como en los ejemplos precedentes, la sustancia objetivo se limpia por cromatografía en columna, y se recristaliza.

Ejemplo 7

Fabricación de zearalenona [U-¹³C₁₈] altamente enriquecida con isótopos

Para la fabricación de zearalenona [U-¹³C₁₈] altamente enriquecida con isótopos, se aplican 1000 ml de medio líquido, compuesto de 0,5 g de KH₂PO₄, 0,5 g de KNO₃, 0,7 g de MgSO₄*7H₂O, 2,0 g de KCl, 17,5 g de glucosa D-[U-¹³C₆], 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄*7H₂O y 20 mg de ZnSO₄*7H₂O, con glucosa D-[U-¹³C₆] como única fuente de carbono, sobre arcilla cocida porosa en forma granulada, concretamente, seramis o lecca, se inoculan con *Fusarium semitectum*, y se incuba a 28 °C y 70 % de humedad relativa del aire, en la estufa incubadora. Después de 3 semanas se extrae el material que contiene la toxina con éter puro de petróleo y mezcla de éter de petróleo / acetato de etilo de 4:1 y 2:1 y, a continuación se limpia a la calidad de referencia (pureza > 98 %) mediante extracción y etapas de cromatografía, como cromatografía por intercambio de iones, cromatografía instantánea en columna con gel de sílice, cromatografía de capa fina, y HPLC preparatoria.

Ejemplo 8Fabricación de roquefortina C - $^{15}\text{N}_5$ altamente enriquecida con isótopos

5 Para la fabricación de una roquefortina C marcada completamente con el isótopo del nitrógeno ^{15}N , se aplican 1000 ml de medio líquido, compuesto de 0,8 g de KH_2PO_4 , 0,7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de KCl, 17,5 g de glucosa D, 1,0 g de $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, 1,5 g de NaH_2PO_4 , 15 mg de $\text{Fe}(\text{II})\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, con $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ como única fuente de nitrógeno, sobre kieselgur bruto, se inoculan con *Penicillium commune*, y se incuba a 12 °C y 70 % de humedad del aire, en la estufa incubadora. Después de 48 días se extrae el material que contiene la toxina con una mezcla orgánica de disolventes compuesta de cloroformo : metanol 9:1 y, a continuación se limpia a la calidad de referencia (pureza > 98 %) mediante extracción líquido – líquido, cromatografía instantánea en columna con gel de sílice y HPLC preparatoria. Por cada carga de 1000 ml se obtienen 300 mg de roquefortina C $^{15}\text{N}_5$ (HPLC-FLD).

Ejemplo 9Fabricación de penicilina $^{15}\text{N}_2$ - ^{33}S altamente enriquecida con isótopos

15 Para la fabricación de una penicilina marcada completamente con el isótopo del nitrógeno ^{15}N , y el isótopo del azufre ^{33}S , se aplican 1000 ml de medio líquido, compuesto de 1,0 g de KH_2PO_4 , 0,2 g de MgCl_2 , 20,0 g de glucosa D, 1,0 g de $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, 0,5 g de $\text{Na}_2^{33}\text{SO}_4$, 1,5 g de Na_2HPO_4 , 5 mg de $\text{Fe}(\text{II})\text{Cl}_2$, con $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ como única fuente de nitrógeno, y $\text{Na}_2^{33}\text{SO}_4$ como única fuente de azufre, sobre pequeños dados de material esponjado, se inoculan con *Penicillium notatum*, y se incuba a 28 °C y 70 % de humedad del aire, en la estufa incubadora. Después de 30 días se extrae el material que contiene la toxina con acetato de etilo y, a continuación se limpia a la calidad de referencia (pureza > 98 %) mediante extracción líquido – líquido, cromatografía instantánea en columna con gel de sílice y HPLC preparatoria. Por cada carga de 1000 ml se obtienen 500 mg de penicilina $^{15}\text{N}_2$ - ^{33}S (HPLC-FLD).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la fabricación de productos metabólicos secundarios, marcados con isótopos, de hongos o bacterias, para la preparación de una sustancia interna de referencia, en la analítica, para estudios de metabolismo en ensayos de alimentación para el ganado, para estudios metabólicos, para el esclarecimiento de ciclos de metabolismo, formas de degradación y/o períodos de degradación, así como almacenamientos, en un medio sintético líquido de cultivo, caracterizado porque la síntesis se realiza mediante inmovilización de los hongos o bacterias en un soporte inerte, con adición de un medio de cultivo sintético líquido en el que al menos el 95 % de los átomos de carbono, de los átomos de nitrógeno y/o de los átomos de azufre, se han sustituido por isótopos estables.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque como fuentes de carbono en el medio sintético líquido de cultivo se emplean azúcares o alcoholes sacáridos, en especial glucosa D- [$U-^{13}C_6$], sacarosa ^{13}C , glicerina ^{13}C y/o acetato ^{13}C , como fuentes de nitrógeno, aminoácidos, nitratos compuestos de amonio o urea ^{15}N , como fuente de azufre, sulfatos, sulfuros o aminoácidos ^{33}S ó ^{34}S .
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el medio sintético líquido de cultivo contiene adicionalmente una mezcla seleccionada de sales inorgánicas o de ácidos y bases, con los iones Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{+++} , Zn^{++} , Cu^{++} , B^{+++} , así como CO_3^{--} , SO_4^{--} , PO_4^{--} , NO_3^- .
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, 2 ó 3, caracterizado porque como soporte inerte se emplea un soporte natural o sintético con gran superficie interna, en especial silicato, silicato laminado, zeolita, bentonita, arcilla cocida, tierra de diatomeas, plásticos o similares.
- 5 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque como soporte inerte se emplea un silicato de aluminio, por ejemplo, una zeolita o un silicato laminado, en especial una vermiculita del grupo de los minerales de mica, en forma natural o tratada.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque como soporte inerte de plástico se emplea material esponjado, poliamida, silicona, polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno, poliéster o similar.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la fabricación se realiza a temperaturas entre 3 y 45 °C, en especial entre 10 y 35 °C.
- 30 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 7, caracterizado porque los productos metabólicos secundarios, marcados con isótopos, se obtienen del medio sintético líquido de cultivo, mediante extracción y concentración, por ejemplo, mediante la combinación de etapas como extracción sólido/líquido - líquido/líquido, centrifugación, filtración, evaporación, concentración y vaporización.
- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque como procedimientos de limpieza, se emplean procedimientos cromatográficos, en especial, cromatografía en columna, cromatografía preparatoria de capa fina, cromatografía iónica, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión y/o cromatografía preparatoria de líquidos, de alto rendimiento.
- 40 10. Producto metabólico secundario, marcado con isótopos, en el que al menos el 95 % de los átomos de carbono, de los átomos de nitrógeno y/o de los átomos de azufre, se han sustituido por los correspondientes isótopos estables, seleccionado del grupo de las micotoxinas, tricotesenos, como nivalenol, deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol, 15-acetil-deoxinivalenol, fusarenona X, T-2 toxina, HT-2 toxina, DAS, fumonisinas como fumonisina B1, B2 ó B3, ocratoxina A, B, C o D, zearalenonas, moniliformina o aflatoxinas como aflatoxina B1, B2, G1 ó G2, ó antibióticos, los antibióticos formados por actinomicetos, como la tetraciclina, estreptomycinina o aminoglucósidos, antibióticos formados especialmente por bacilos, como bacitracina o polimixina, antibióticos formados por penicillium, como penicilina o griseofulvina, o cefalosporina formada por cefalosporium, que haya sido fabricado según alguna de las reivindicaciones 1 a 9, para la preparación de una sustancia interna de referencia, en la analítica, para estudios de metabolismo en ensayos de alimentación para el ganado, para estudios metabólicos, para el esclarecimiento de ciclos de metabolismo, formas de degradación y/o períodos de degradación, así como almacenamientos.
- 45 11. Producto metabólico secundario según la reivindicación 10, como sustancia pura con un grado de marcado con ^{13}C , ^{15}N , ^{33}S ó ^{34}S de al menos el 95 %.

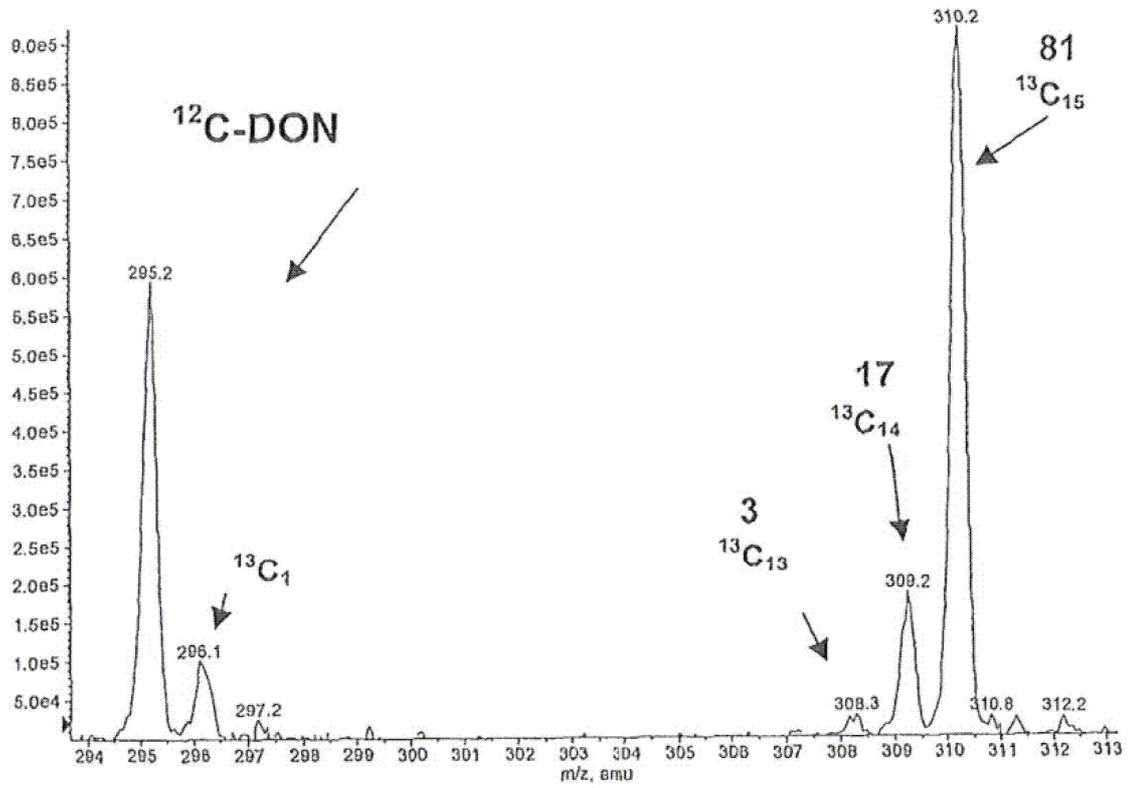


Fig. 1

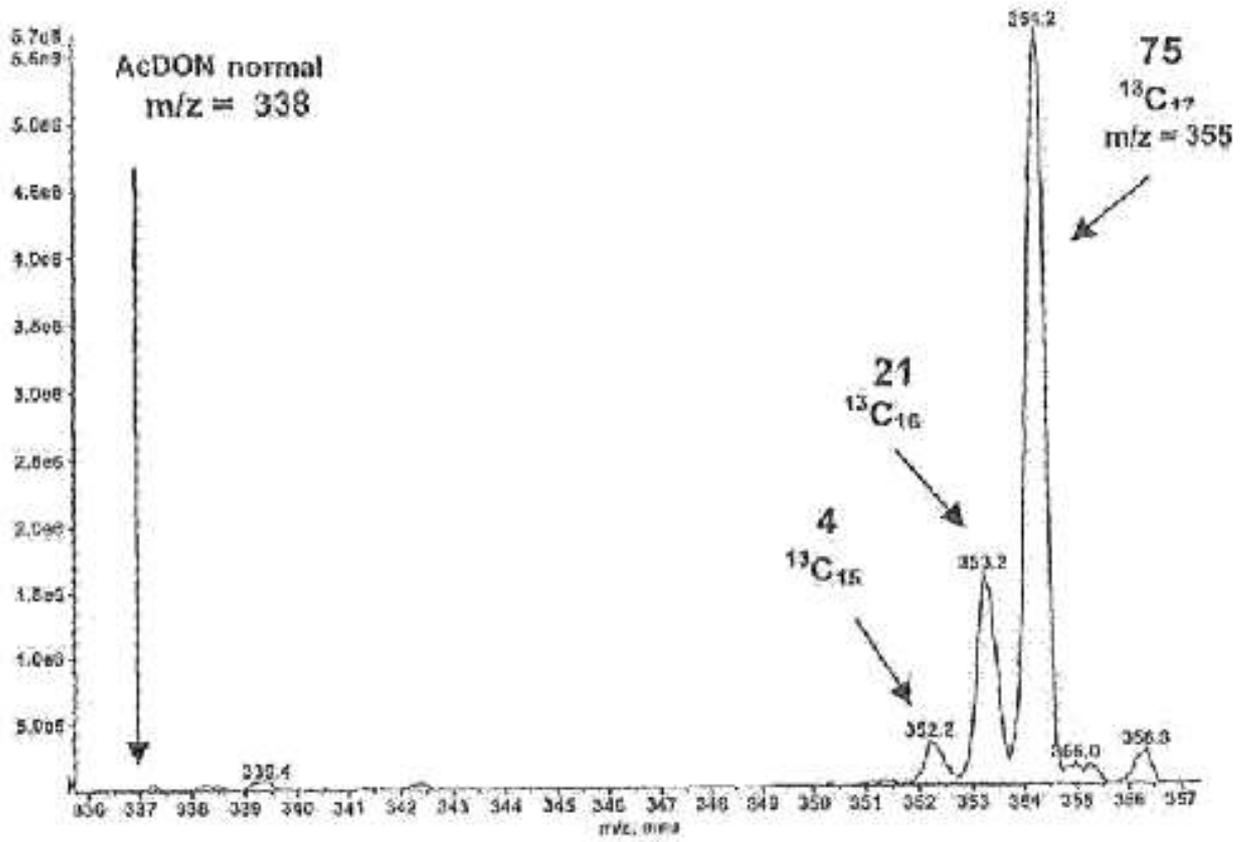


Fig. 2