

REF: Case 3019

415221



Int. Cl. C12D

F.C. 10-XI-75

NUMERO 415.221

# MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un...

## PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: (1) ABBOTT LABORATORIES  
(2) KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

RESIDENCIA: (1) 14th Street & Sheridan Rd., NORTH  
CHICAGO, Illinois, U.S.A.  
(2) Ohtemachi Building, Ohtemachi, Chiyoda-ku  
TOKYO (japón)

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL  
ANTIBIOTICO XK-62-2"

Prioridad: Patente japonesas n.º 52177/72 del 27-5-72  
" 90477/72 11-9-72



415221  
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1  
5  
Esta invención se refiere a un nuevo antibiótico, identificado como XK-62-2 y a un procedimiento para la producción del mismo. Más especialmente, esta invención se refiere a un procedimiento que consiste en cultivar un microorganismo productor del antibiótico XK-62-2 perteneciente al género Micromonospora, en un medio adecuado para formar un nuevo antibiótico XK-62-2 y recuperar el antibiótico del líquido de cultivo.

10  
15  
20  
El nuevo antibiótico XK-62-2 es un antibiótico básico, soluble en agua, con una actividad antibacteriana muy intensa contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. También posee intensa actividad antibacteriana contra Staphylococcus aureus y Escherichia coli, que son resistentes a varios antibióticos conocidos. Además, este antibiótico es muy eficaz sobre los microorganismos del género Proteus y Pseudomonas sobre los que se conocen muy pocos antibióticos efectivos y de los microorganismos del género Pseudomonas, este antibiótico es especialmente efectivo sobre las variedades que son resistentes al antibiótico gentamicina. C<sub>1a</sub>. (Cooper y colaboradores: Journal of Chemical Society 1971, pág. 3126-3129).

25  
30  
Se ha encontrado que el XK-62-2 presenta un efecto terapéutico excelente sobre diversas infecciones (de seres humanos y animales) causadas por las diversas bacterias flogógenas antes descritas. A la vista de su excelente actividad antibacteriana, el XK-62-2 puede ser utilizado para fines medicinales como antibiótico. También puede ser utilizado como aditivo de los piensos para animales como promotor del desarrollo.

415221



1978

1                   Debido a su carácter, que será descrito con más detalle más adelante, se cree que el nuevo antibiótico pertenece al complejo gentamicina.

5                   La producción del antibiótico básico gentamicina está descrita en la patente estadounidense nº 3.091.572. Así, se sabe que la gentamicina, así como dos fracciones adicionales, identificadas como fracción A y fracción B, puede ser producida por microorganismos que pertenecen a la especie Micromonospora echinospora y Micromonospora purpurea. Otros  
10                   investigadores han determinado que el complejo gentamicina contiene otros seis componentes adicionales. "Separation, Structural y Physical Studies o de Gentamicin C Complex", Kershner, Rutgers, State University of New Jersey, 1971. Estos seis componentes son denominados C<sub>1</sub>, C<sub>2a</sub>, C<sub>2-I</sub>, C<sub>2-II</sub>,  
15                   C<sub>2-III</sub> y C<sub>1a</sub>.

                  El antibiótico de esta invención está estrechamente relacionado con la fracción C<sub>2a</sub>, pero debido a importantes diferencias en el espectro de resonancia magnética nuclear, que serán descritas con más detalle más adelante, el antibiótico de  
20                   esta invención se considera diferente de la fracción C<sub>2a</sub> conocida en la técnica anterior.

#### COMPENDIO DE LA INVENCION

                  De acuerdo con esta invención, el antibiótico XK-62-2 es producido por fermentación de microorganismos pertenecientes al género Micromonospora en un medio nutritivo adecuado y después aislamiento del antibiótico específico. En este  
25                   aspecto, los inventores han aislado una nueva especie del género Micromonospora que produce fácilmente el antibiótico. El cultivo tipo ha sido denominado Micromonospora sagamiensis MK  
30                   65 y dos variedades que también han sido identificadas han si-

415221



1 do denominadas Micromonospora sagamiensis var. nonreducans  
MK-62 y Micromonospora sagamiensis var. flava Mm 628. Estas  
tres variedades han sido depositadas en la American Type Cul-  
5 ture Collection, Rockville, Maryland y han recibido los núme-  
ros de accesoión 21826, 21803 y 21827, respectivamente. Las va-  
riedades presentan las siguientes propiedades:

I. Morfología:

10 Se forman micelios de substrato no septados, ramifica-  
dos y bien desarrollados, con un diámetro de aproximadamente  
0,5  $\mu$ , pero no se forma un verdadero micelio aéreo. Se for-  
man esporas muy bien y se producen esporas simples en los ex-  
tremos de esporoforos simples (de 1,0-2,0 u de longitud) ra-  
mificados desde los micelios del substrato. Se forman muchas  
15 esporas alrededor de los extremos de los micelios del substra-  
to. Las esporas maduras tienen un diámetro de 1,0  $\mu$  aproxima-  
mente y son de forma oval o esférica con una superficie áspe-  
ra.

II. Características de cultivo sobre diversos medios:

20 Variedad MK 65: El crecimiento es pardo sobre medios  
de ágar bien desarrollados, formando muchas esporas pero es  
naranja sobre medios de pobre desarrollo sobre los que se for-  
man escasamente algunas esporas. Algunas veces el tono de co-  
lor varía con el medio.

25 Variedad Mm 628: El crecimiento es muy pobre en me-  
dios sintéticos ordinarios y crece bien solamente sobre me-  
dios naturales formando una capa de esporas. El tono de color  
es claramente diferente del de la variedad MK-65 en todos los  
medios, presentando un color entre mostaza y trigo claro.  
30 Cuando madura, el crecimiento es de parduzco a negruzco debi-  
do al color de las esporas y algunas veces grisáceo.

- 5 -  
415 22 1 1/2 6



1 Variedad MK 62: Generalmente se producen muchas es-  
poras sobre medios de ágar que crecen bien, en los cuales el  
crecimiento es en su mayor parte pardo oscuro. Sin embargo,  
5 el crecimiento es naranja sobre los medios de crecimiento  
pobre y las esporas no se forman fácilmente. Además, se for-  
ma una espora negra en los medios de ágar sobre los que el  
crecimiento de los micelios del substrato es pobre pero las  
esporas se forman fácilmente. En los medios líquidos, el cre-  
cimiento es naranja debido al color del medio de substrato.

10 Las características del cultivo en diversos medios  
después de cultivar a 27°C durante dos semanas se encuentran  
en la Tabla I. Las indicaciones de color se dan de acuerdo  
con las clasificaciones en el Color Harmony Manual (Container  
Corporation of America).

TABLA I

Variedades Medio	<u>Micromonospo- ra sagamien- sis var. non- reducans MK 62</u>	<u>Micromonos- pora saga- miensis MK 65</u>	<u>Micromonosco- ra sagamien- sis var. Fla- va Km 628</u>
Agar de Czapek	C: moderado, plano  S: amarillo me lón brillan te (3 ia) a pardo oscu- ro (3 pn)  PS: ninguno	C: moderado, plano  S: albarico- que (4 ga) a pardo os- curo (4 nl)  PS: ninguno	C: pobre
25 Agar glucosa- asparaguina	C: moderado, plano  S: alcana rojo ladrillo (5 ng)  PS: ninguno	C: pobre a mo- derado, plano  S: rojo teja (5 ne)  PS: ninguno	C: pobre
30 Agar nutriente	C: pobre a mo- derado, plano	C: pobre a mo- derado, plano	C: pobre a modera- do plano



415221

TABIA I (continuación)

	Variedades	<u>Micromonospora sagamiensis</u> var. nonreducans MK 62	<u>Micromonospora sagamiensis</u> MK 65	<u>Micromonospora sagamiensis</u> var. Flaviva Mm 628
1	Medio			
5	Agar nutriente	S: naranja (4 la)  PS: ninguno	S: oro claro (2 ic)  PS: ninguno	S: trigo claro (2 ea)  PS: ninguno
	Medio			
10	Agar albúmina de huevo	C: pobre, plano, capa de esporas negras	C: pobre a moderado, plano  S: marrón ca-cao (5 lg)  PS: ninguno	C: pobre
15	Agar almidón	C: moderado, granular  S: marrón cobre claro (5 pg)  PS: ninguno	C: moderado, granular  S: marrón intenso (4 pl)  PS: ninguno	C: pobre
20	Agar extracto de malta-extracto de levadura	C: moderado, levantado  S: marrón intenso (5 pl)  PS: ninguno	C: moderado, granular  S: castaño (4 ni)	C: bueno, levantado, acanalado  S: pardo mostaza (2 pl) a negro  PS: ninguno
25	Agar harina de avena	C: pobre, plano  S: naranja (4 la)  PS: ninguno	C: pobre, plano  S: naranja (4 la)  PS: ninguno	C: pobre  S: pardo mostaza (2 pl) a negro  PS: ninguno
30	Agar dextrosamina NZ (1:3)	C: moderado, levantado  S: color cuero (4 ne)	C: moderado, plano  S: amarillo brillante (3 la)	C: pobre, granulado  S: trigo claro (2ea)

415221



1

TABLA I (continuación)

Variedades Medio	Micromonospora sagamiensis var. nonreducans MK 62	Micromonospora sagamiensis MK 65	Micromonospora sagamiensis var. Flava Mm 628
5 Agar dextrosamina NZ (1:3)	PS: ninguno	PS: ninguno	PS: ninguno
Agar de Bennett	C: moderado, levantado, acanalado S: naranja polvoriento (4 lc)	C: moderado, granular S: color rosable (4 pi)	C: moderado, plano S: pardo mostaza (2 pi)
10 Agar de Emerson	PS: ninguno C: pobre, plegado multiple S: naranja brillante (4 na)	PS: ninguno C: pobre a moderado, granular S: naranja (4 la)	SP: ninguno C: moderado, granular S: amarillo melón brillante (3 ia)
15 Agar glucosa-extracto de levadura	PS: ninguno C: moderado, levantado S: naranja brillante (4 na)	PS: ninguno C: moderado, granular S: naranja bermejo (4 nc)	PS: ninguno C: moderado, granular S: pardo mostaza (2 pi)
20	PS: ninguno	PS: ninguno	PS: ninguno

C: crecimiento; S: color del micelio del substrato; PS: pigmento soluble.

III. Propiedades fisiológicas:

25

Las propiedades fisiológicas de las variedades MK 62, MK 65 y Mm 628 se encuentran en la Tabla II. La temperatura óptima es determinada al cabo de 5 días de cultivo y la acción sobre la leche y sobre la descomposición de la celulosa son observadas después de un mes de cultivo. Las otras observaciones se realizan sobre un cultivo a 27° durante 2 semanas.

30

415221



TABLA II

	<u>Propiedades fisiológicas</u>	<u>Micromonospora sagamiensis var. nonreducans MK 62</u>	<u>Micromonospora sagamiensis MK 65</u>	<u>Micromonospora sagamiensis var. flaviva Mm 628</u>
1				
5	Licuefacción de la gelatina	-	±	±
	Licuefacción de la leche	-	+ (lentamente)	+ (lentamente)
	Coagulación de la leche	-	-	-
10	Descomposición de la celulosa	±	±	±
	Hidrólisis del almidón	+	+	+
	<u>Utilización de fuentes de carbono</u>			
15	D-arabinosa	-	-	+
	D-galactosa	++	+	±
	D-glucosa	++	++	++
	Glicerol	-	-	-
	D-lactosa	-	-	-
	Levulosa	++	+	-
20	L-inositol	-	-	-
	D-manitol	-	-	-
	D-rafinosa	-	-	-
	L-ramnosa	-	-	-
	D-xilosa	++	++	++
	Sacarosa	+	+	+
25	pH de crecimiento óptimo	7,0-8,0	7,0-8,0	7,0-8,5
	Temperatura de crecimiento óptimo	35-40°C	30-40°C	30-40°C
	Reducción de nitrato	-	+	-
	Formación de tiro-sinasa	-	-	-
30	Formación de melanoide	-	-	-

415221



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

Como las variedades MK-65 y Mm 628 no forman verdaderos micelios aéreos y forman una sola espora sobre los micelios del substrato, estas variedades se consideran pertenecientes al género Micromonospora. Los microorganismos conocidos del género Micromonospora pueden ser clasificados en cuatro grupos basándose en el color del micelio, a saber: grupo naranja, grupo rojo violáceo, grupo verde azulado y grupo marrón. A la vista de las diferencias del tono de color y de otras diferencias establecidas en las anteriores Tablas I y II, se determinó que las variedades MK-62, MK-65 y Mm 628 pertenecían a una nueva especie del género Micromonospora.

La variedad MK-65 fué elegida como cultivo tipo y fué denominada Micromonospora sagamiensis debido a que había sido aislada de un terreno forestal de los suburbios de Sagami-hara-shi, Kanagawa-ken, Japón. La variedad MK-62 presenta propiedades muy similares a las de la variedad MK-65, excepto una diferencia en la reducción del ácido nítrico, licuación y coagulación de leche y color del micelio en diversos medios. Por consiguiente, la variedad MK-62 ha sido considerada como una variante del cultivo tipo y denominada Micromonospora sagamiensis var. nonreducans, debido a que no reduce al ácido libre. La variedad Mm 628, por otra parte, es diferente de las dos primeras en que el crecimiento generalmente es más pobre y en un medio de agar su color es de pardo mostaza a trigo claro y utiliza D-arabinosa pero no levulosa. Por consiguiente, esta variedad también se consideró una variante del cultivo tipo y fué denominada Micromonospora sagamiensis var. flava debido a su tono de color amarillo.

Además de producir el antibiótico XK-62-2, también se ha encontrado que los miembros de esta nueva especie,

415221



1 antes descritos, producen otros antibióticos como los clasificados como pertenecientes al complejo gentamicina C. Por consiguiente, esta invención también comprende el nuevo procedimiento de producción de estos últimos antibióticos.

5 También hemos encontrado que algunas otras variedades pertenecientes al género Micromonospora producen el antibiótico XK-62-2, a saber: Micromonospora echinospora ATCC 15837, Micromonospora echinospora var. ferruginea NRRL 2995, Micromonospora echinospora var. pallida NRRL 2996,  
10 ATCC 15836, ATCC 15838 y Micromonospora purpurea NRRL 2953, ATCC 15835. Estas variedades están totalmente descritas en la patente estadounidense nº 3.091.572 (publicación de patente japonesa nº 21394/69) y se sabe que producen el antibiótico gentamicina. Sin embargo, hasta ahora no se había observado que estas variedades producían el antibiótico de esta  
15 invención. Las variedades citadas están depositadas en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. De hecho un mutante MK-62-164 (ATCC 21949) se derivó a partir de MK-62 y el mutante produce de forma característica  
20 XK-62-2.

Como ocurre con otras variedades de actinomicetos, los microorganismos que son útiles en esta invención pueden experimentar mutaciones por medios artificiales tales como radiación con luz ultravioleta, radiación con  $Co^{60}$ , radiación con rayos X y diversos productos químicos inductores de  
25 mutaciones. Por consiguiente, cualquier variedad, incluso aunque esté mutada, puede ser utilizada en esta invención siempre que pueda producir el antibiótico XK-62-2.

30 Generalmente pueden emplearse los métodos convencionales de cultivo de los microorganismos del género actino



415221

1 micetos en el procedimiento de esta invención. En el medio de  
cultivo pueden emplearse diversas fuentes nutrientes. Como  
fuente de carbono puede utilizarse la glucosa, el almidón,  
5 manosa, fructosa, sacarosa, dextrina, melazas, etc, solas o  
en combinación. Además, pueden utilizarse hidrocarburos, al  
coholes, ácidos orgánicos, etc, según la capacidad de utili-  
zación que presente el microorganismo. Las fuentes de nitróge-  
no orgánicas e inorgánicas como cloruro amónico, sulfato amó-  
nico, urea, nitrato amónico, nitrato sódico, etc y las fuen-  
10 tes de nitrógeno naturales como peptona extracto de carne, ex-  
tracto de levadura, levadura seca, licor de infusión de maíz,  
harina de soja, casaminoácido, proteína vegetal soluble, etc,  
pueden ser utilizadas solas o en combinación. Además pueden -  
agregarse al medio, si es necesario, sales inorgánicas como  
15 cloruro sódico, cloruro potásico y carbonato y fosfato cálcico.  
Además pueden agregarse adecuadamente materias orgánicas o  
inorgánicas capaces de provocar el crecimiento del microorga-  
nismo.

20 El más adecuado para este procedimiento es un mé-  
todo de cultivo líquido, especialmente un método de cultivo  
agitado y sumergido. La temperatura de cultivo está compren-  
dida entre 25°C y 55°C y es conveniente llevar a cabo el cul-  
tivo a un pH aproximadamente neutro.

25 El antibiótico de esta invención se forma y acu-  
mula en el líquido de cultivo habitualmente al cabo de 1 a 12  
días de cultivo. Cuando el rendimiento de XK-62-2 en el líqui-  
do de cultivo alcanza un valor máximo, se interrumpe el cul-  
tivo y el producto deseado se aísla y purifica del líquido  
de cultivo después de que las células microbianas han sido  
30 separadas, por ejemplo por filtración.

El aislamiento y la purificación del antibiótico

415221



1

del filtrado se lleva a cabo por los métodos de aislamiento utilizados en el aislamiento y purificación de los productos metabólicos microbianos del líquido de cultivo.

5

Como el XK-62-2 es básico y muy soluble en agua pero escasamente soluble en los disolventes orgánicos habituales, el producto deseado puede ser purificado por los métodos habitualmente empleados para la purificación de los llamados antibióticos básicos solubles en agua. Más específicamente, el XK-62-2 puede ser purificado mediante una combinación adecuada de adsorción y desorción de una resina cambiadora de catión y carbón activo; cromatografía en columna empleando celulosa, Sephadex LH-20 y gel de sílice y métodos similares. Como la base libre de esta sustancia es soluble en acetona y el sulfato es escasamente soluble en metanol, la sustancia deseada puede ser disuelta y precipitada combinando adecuadamente estas propiedades.

10

15

20

25

Por ejemplo, el filtrado del cultivo es ajustado en primer lugar a un pH de 7,5 y después sometido a adsorción sobre una resina cambiadora de catión IRC-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavar con agua, se eluye con amoníaco acuoso 1N. La fracción activa se concentra a presión reducida. Después el concentrado se trata con una resina cambiadora de anión, Dowex 1x2 (forma  $\text{OH}^-$ ) y se concentra de nuevo a presión reducida. El concentrado se ajusta a un pH de 10,5 aproximadamente y se añade al mismo 5 volúmenes de acetona. El precipitado resultante se separa por filtración y el filtrado se concentra y ajusta a pH 4,5 con ácido sulfúrico. A este concentrado se añaden 5-10 volúmenes de metanol. El precipitado se recupera por filtración y se seca a vacío. Se obtiene un polvo crudo blanco.

30

El polvo crudo así obtenido se disuelve en la capa inferior de una mezcla disolvente de cloroformo, isopropanol

415221



1 y amoníaco acuoso (2:1:1) y la solución resultante se somete  
a cromatografía en columna de gel de sílice. La elución se  
realiza con el mismo disolvente y a un caudal de aproximada-  
mente 30 ml/hora. Se recogen las fracciones de XK-62-2 y se  
5 concentran a presión reducida. Después de liofilizar el con-  
centrado, se obtiene una base libre blanca del antibiótico.  
Alternativamente, el concentrado de la fracción activa se ajusta  
a pH 4,5 con ácido sulfúrico y después se somete a filtra-  
ción. Después de liofilizar el filtrado, se obtiene un sulfa-  
to blanco de XK-62-2.  
10

EL ANTIBIOTICO

La base libre del antibiótico XK-62-2 es un pol-  
vo básico blanco. El análisis elemental revela las siguien-  
tes proporciones: C, 51,90 %; H, 8,81 %; N, 15,18 % y O,  
15 24,11 % (por diferencia). El punto de fusión del sulfato es  
260°C (con descomposición). La rotación específica de la ba-  
se libre es  $[\alpha]_D^{20} = +116^\circ$  (c = 1, H<sub>2</sub>O).

La Figura 1 ilustra el espectro de absorción ul-  
travioleta de una solución acuosa de XK-62-2. Este no presen-  
ta ningún máximo de absorción característico entre 220 y 360  
20 mμ y solamente presenta absorciones terminales.

La Figura 2 ilustra el espectro de absorción in-  
frarrojo del antibiótico (pastilla de KBr). Como se observa  
en la figura, el XK-62-2 presenta picos a las siguientes lon-  
gitudes de onda expresadas en cm<sup>-1</sup>:  
25

610, 1040, 1110, 1285, 1340, 1390, 1460, 1510,  
1620, 2050, 2920, 3030, 3350.

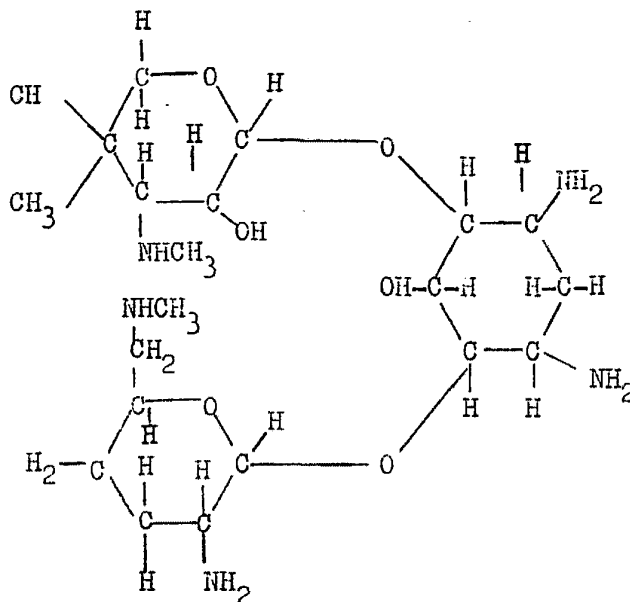
El espectro RMN del sulfato de XK-62-2 está ilus-  
trado en la Figura 3. El espectro RMN se mide con un espec-  
trómetro Varian Associates HA-100 después de haber sustituido  
30



1 los átomos de hidrógeno del XK-62-2 por átomos de deuterio  
 mediante liofilizaciones repetidas en agua pesada. Las absor-  
 ciones a 5,60 ppm y 6,32 ppm están determinadas sobre el pro-  
 tón anomérico del azúcar constituyente. Las absorciones de  
 5 los grupos N-metilo y C-metilo terciario están confirmadas  
 respectivamente a 3,38 ppm y 1,80 ppm. Característicamente  
 se observa otra absorción del grupo N-metilo a 3,21 ppm con  
 una diferencia de 0,17 ppm de 3,38 ppm.

Como resultado de la medida del espectro de masas  
 10 utilizando un aparato con un alto poder de resolución, se  
 determina que el XK-62-2 tiene un ión molecular  $(M+1)^+$  de  
 464, por lo tanto un peso molecular de 463 y una fórmula mo-  
 lecular de  $C_{20}H_{41}N_5O_7$ . Por consiguiente, los valores analíti-  
 cos elementales calculados son: C, 51,84 %; H, 8,86 %; N,  
 15 15,12 % y O, 24,19 %.

Basándose en los datos anteriores, se atribuye la  
 siguiente fórmula estructural al antibiótico XK-62-2:



La base libre del XK-62-2 es muy soluble en agua,  
 soluble en metanol, ligeramente soluble en etanol o acetona.

415221



1 pero muy soluble en disolventes orgánicos como cloroformo,  
 benceno, acetato de etilo, acetato de butilo, éter, metanol,  
 éter de petróleo, n-hexano, etc. El sulfato de XK-62-2 es  
 5 muy soluble en agua pero insoluble en disolventes orgánicos  
 como metanol, acetona, etc.

Los valores Rf del XK-62-2 obtenidos como resul-  
 tado de la cromatografía en papel y la cromatografía en capa  
 fina utilizando diversos desarrolladores están indicados en  
 la siguiente Tabla III.

10

TABLA III

1) Valores Rf del XK-62-2 por cromatografía ascendente en pa-  
 pel (28°C)

	<u>Desarrollador</u>	<u>Valor Rf</u>	<u>Periodo de desa- rrollo (horas)</u>
15	Cloruro amónico al 20 % (pe- so/volumen)	0,98	3
	n-butanol saturado de agua	0,00	15
	n-butanol/ácido acético/agua (3:1:1)	0,06	15
	Acetato de etilo saturado de agua	0,00	4
20	n-butanol saturado de agua conte- niendo 2 % (peso/volumen) de ácido p-toluensulfónico y 2 % (peso/volumen) de piperidina	0,03	15

2) Valores Rf del XK-62-2 por cromatografía en capa fina de  
 gel de sílice (a la temperatura ambiente)

	<u>Desarrollador</u>	<u>Valor Rf</u>	<u>Periodo de desa- rrollo (horas)</u>
25	La capa superior de una mezcla de cloroformo, metanol y amoníaco acuoso al 17 % (2:1:1 en volumen)	0,86	3
	Acetato amónico al 10 % en meta- nol (1:1 en volumen)	0,21	3

30

Los valores Rf del XK-62-2 comparados con los de  
 antibióticos conocidos por cromatografía en papel utilizando



1 un desarrollador de la capa inferior de cloroformo, metanol y amoniaco acuoso al 17 % (2:1:1) están indicados en la siguiente Tabla IV.

TABLA IV

5 Cromatografía ascendente en papel (a la temperatura ambiente)  
Periodo de desarrollo: 12 horas

	<u>Antibióticos</u>	<u>Valor Rf</u>
	Gentamicina A	0,00
	Gentamicina C <sub>1a</sub>	0,18
10	Gentamicina C <sub>2</sub>	0,38
	Gentamicina C <sub>1</sub>	0,59
	Antibiótico n° 460	0,01
	Sisomicina	0,18
	Neomicina A	0,00
15	Neomicina B	0,02
	Kanamicina A	0,01
	Kanamicina B	0,00
	Paromomicina	0,02
	Complejo nebramicina	0,02
20	Tobramicina	0,00
	XK-62-2	0,49

Basándose en las determinaciones anteriores, se considera que el antibiótico de la invención pertenece al complejo gentamicina. Como ya se ha indicado anteriormente, la producción del antibiótico gentamicina está descrita en la patente estadounidense n° 3.091.572. En esta patente se descubren las propiedades y estructura de la gentamicina así como de otras dos fracciones asociadas identificadas como fracción A y fracción B. Posteriormente se han aislado otras fracciones adicionales. Por ejemplo, en la tesis de



1 Allan S. Kershner, "Separation, Structural and Physical  
Studies on The Gentamicin C Complex", Rutgers University,  
The State University of New Jersey, 1971, se describe una se-  
rie de antibióticos de gentamicina identificados como C<sub>1</sub>,  
5 C<sub>2a</sub>, C<sub>2</sub>-I, C<sub>2</sub>-II, C<sub>2</sub>-III y C<sub>1a</sub>.

El antibiótico de esta invención, aunque estrecha-  
mente asociado a los antibióticos conocidos dentro del comple-  
jo gentamicina, se ha determinado no obstante que es un anti-  
biótico hasta ahora no conocido basándose en las caracterís-  
10 ticas antes descritas, especialmente el espectro de absorción  
ultravioleta, el espectro de absorción infrarrojo y el espec-  
tro de resonancia magnética nuclear. Más específicamente, co-  
mo ya se ha dicho, el antibiótico de esta invención es espe-  
cialmente semejante a la fracción C<sub>2a</sub> de la gentamicina. Como  
15 se ha dicho, esta fracción no tiene el mismo espectro de re-  
sonancia magnética nuclear que el antibiótico de esta inven-  
ción. Por lo tanto, el XK-62-2 se considera una nueva sustan-  
cia que posee excelentes propiedades antibióticas, como se  
ilustrará en las siguientes tablas.

20 Los espectros antibacterianos del XK-62-2 contra  
diversos microorganismos están indicados en la siguiente Ta-  
bla V.

TABLA V

Espectros antibacterianos del XK-62-2 por el método de dilu-  
25 ción en ágar

<u>Microorganismos ensayados</u>	<u>Concentración mí- nima de inhibición (γ/ml)</u>
<u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 10541	1,05
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	< 0,0041
<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8942 (resisten- 30 te a la kanamicina, paromomicina y es-	

415221



TABLA V (continuación)

	Microorganismos ensayados	Concentración mínima de inhibición (γ/ml)
	treptomomicina)	0,065
5	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8950 (resistente a la estreptomomicina, tetraciclina, penicilina y sulfonamidas)	0,0082
	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8953 (resistente a la estreptomomicina, kanamicina, paromomicina, tetraciclina, neomicina, kanendomicina y eritromicina)	0,0041
10	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8956 (resistente a la estreptomomicina, paramomicina, tetraciclina, eritromicina y oleandomicina)	< 0,001
	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8957 (resistente al cloranfenicol, estreptomomicina, kanendomicina, tetraciclina y paromomicina)	0,0021
15	<u>Bacillus subtilis</u> nº 10707	< 0,004
	<u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	0,016
	<u>Bacillus cereus</u> var. <u>mycoides</u> ATCC 9463	0,0082
	<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	0,0082
	<u>Escherichia coli</u> ATCC 26	0,0082
20	<u>Escherichia coli</u> KY 8302 (resistente al cloranfenicol, estreptomomicina, kanamicina, paromomicina, tetraciclina y espectinomomicina)	0,033
	<u>Escherichia coli</u> KY 8310 (resistente al cloranfenicol, estreptomomicina, kanamicina, gentamicina, kanendomicina, paromomicina, tetraciclina y espectinomomicina)	1,05
25	<u>Escherichia coli</u> KY 8314 (resistente a la estreptomomicina)	0,0082
	<u>Escherichia coli</u> KY 8315 (resistente a la estreptomomicina, kanamicina, paromomicina y neomicina)	0,016
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH nº 1	0,53
30	<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	0,03
	<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	0,07
	<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 9992	0,018



315

415221

1 La actividad in vitro del XK-62-2 contra una va-  
riedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas es muy  
superior a la de la estreptomycinina y de la kanamicina y su  
actividad es comparable a la de la gentamicina. Las activi-  
5 dades comparativas in vitro de estos antibióticos contra di-  
versos microorganismos del género Proteus están indicadas  
en la siguiente Tabla VI.

La actividad antibacteriana del XK-62-2 contra di-  
versas variedades clínicamente aisladas de Pseudomonas aeru-  
10 ginosa también se ha comparado con las de la estreptomycinina,  
kanamicina, complejo gentamicina y gentamicina C<sub>1a</sub> y están  
indicadas en la siguiente Tabla VII.

Además, la actividad in vivo del XK-62-2 contra  
las infecciones bacterianas patógenas se ha determinado en  
15 ratones. Los ratones se infectan con un inoculum de Pseudo-  
monas aeruginosa BMH nº 1 o Pseudomonas aeruginosa XY 8510  
por inyección intraperitoneal. Después se tratan con diver-  
sas dosis del antibiótico experimental por inyección subcu-  
tánea. El efecto del XK-62-2 de protección contra las infec-  
20 ciones bacterianas está indicado en la siguiente Tabla VIII,  
en la que se utilizaron 10 ratones en cada ensayo.

25

30



415221

TABLA VI

Concentración mínima de inhibición (γ/ml: por el método de dilución de ágar)

Microorganismos	XK-62-2	Complejo gentamicina	Estreptomicina	kanamicina
<u>Proteus vulgaris</u> KY 4296	0,021	0,021	-	-
<u>Proteus vulgaris</u> KY 4297	0,021	0,021	-	-
<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	0,04	0,04	>40	0,34
<u>Proteus vulgaris</u> Abbott JJ	0,021	0,021	>40	0,16
<u>Proteus mirabilis</u> Finland 9	0,04	0,04	>40	0,04
<u>Proteus mirabilis</u> nº 825	0,021	0,021	>40	0,04
<u>Proteus mirabilis</u> nº 39	0,021	0,04	>40	0,33
<u>Proteus morganii</u> Jenkins	0,04	0,04	>40	0,16
<u>Proteus rettgeri</u> Booth	0,021	0,021	>40	0,08
<u>Proteus rettgeri</u> Hambrook	0,021	<0,01	>40	0,08

TABLA VII

Concentración mínima de inhibición (γ/ml: por el método de dilución de ágar)

Variedades de Pseudomonas aeruginosa	XK-62-2	Complejo gentamicina	Gentamicina C <sub>1a</sub>	Estreptomicina	kanamicina
KY 4276	0,33	0,33	0,33	2,6	1,63
KY 8510	0,33	1,3	2,6	0,65	13
KY 8511	>42	42	42	>2500	13
KY 8512	0,33	0,65	0,33	42	3,3
KY 8514	0,55	1,3	0,33	156	208
KY 8515	>42	62	>42	624	416
KY 8516	0,33	1,3	5,2	0,65	26
KY 8520	0,33	0,65	0,33	5,2	104
KY 8562	>42	62	>42	156	167

415 221



1975

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

TABLA VIII

Dosis (mg/ratón)	Pseudomonas aeruginosa BMH nº 1		Pseudomonas aeruginosa KY 8510		
	XK-62-2	Complejo gen- tamicina	XK-62-2	Comple- jo gen- tamicina	Gentami- cina
Supervivencia de ratones (%)					
2	100	100	100	90	20
1	90	100	80	40	10
0,5	50	70	50	30	0
0,25	10	20	30	10	0
0,125	0	0	0	0	0

Como evidencia todo lo anterior, el XK-62-2 presenta una actividad antibacteriana muy intensa contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. El XK-62-2 también presenta una intensa actividad antibacteriana contra Staphylococcus aureus y Escherichia coli que son resistentes a diversos antibióticos conocidos y es especialmente eficaz sobre los microorganismos del género Proteus y Pseudomonas sobre los que hasta ahora se conocen pocos antibióticos eficaces.

En las tablas anteriores se observa que el XK-62-2 presenta una excelente actividad antibacteriana y un excelente efecto terapéutico contra ciertas variedades (aislados clínicos) de Pseudomonas aeruginosa en comparación los del complejo gentamicina o gentamicina C<sub>1a</sub>, que es uno de los componentes del complejo gentamicina. Más específicamente, el XK-62-2 presenta una actividad antibacteriana contra Pseudomonas aeruginosa KY 8510 y KY 8516 mucho mayor que el complejo gentamicina o que la gentamicina C<sub>1a</sub>. Como resultado de estudios enzimológicos, se ha encontrado que las variedades KY 8510 y 8516 contienen un sistema enzimático específico que

415 221



1 inactiva a la gentamicina C<sub>1a</sub> o a la kanamicina por acetila-  
ción del grupo 6'-NH<sub>2</sub> de la purporosamina de la gentamicina  
C<sub>1a</sub> o del grupo 6'-NH<sub>2</sub> de la kanamicina. Esta es la razón fun-  
damental por la cual las variedades KY 8510 y 8516 son resis-  
5 tentes especialmente a la gentamicina C<sub>1a</sub>. Sin embargo, estas  
dos variedades son sensibles al XK-62-2. Se considera que ello  
es debido a que el XK-62-2 no es acetilado por este enzima  
desactivante ya que el grupo 6'-NH<sub>2</sub> del XK-62-2 está metilado.  
Así, en comparación con la gentamicina C<sub>1a</sub> o con el complejo  
10 gentamicina que contiene gentamicina C<sub>1a</sub>, el XK-62-2 es espe-  
cialmente efectivo en su actividad antibacteriana contra  
Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli y Klebsiella pneumo-  
niae que presentan este mecanismo de resistencia acetilante.

Otros antibióticos, a saber el complejo gentamicina  
15 [M.J. Weinstein y colaboradores: Antimicrobial Agents and Che-  
motherapy (1963) I y D.J. Cooper y colaboradores: J. Infect.  
Dis. 119, 342 (1969)], el antibiótico nº 460 (solicitud de pa-  
tente japonesa 16153/71) y la sisomicina [M.J. Weinstein y co-  
20 laboradores: J. Antibiotics 23, 551, 555, 559 (1970)] son anti-  
bióticos básicos solubles en agua, con un amplio espectro anti-  
microbiano que son producidos por microorganismos del género  
Micromonospora. Sin embargo, como resulta claramente evidente  
de lo anterior, el XK-62-2 se distingue fácilmente de cualquie-  
ra de las gentamicinas A, C<sub>1a</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>1</sub>, todos ellos componen-  
25 tes del complejo gentamicina, del antibiótico nº 460 y de la  
sisomicina en los valores R<sub>f</sub> obtenidos por cromatografía en  
papel. Los antibióticos aminoglucosidos básicos, solubles en  
agua, por ejemplo la neomicina A, neomicina B, kanamicina A,  
kanamicina B, paromomicina, complejo nebramicina y tobramici-  
30 na, se considera que poseen propiedades similares a las del

415221



MAY. 1973

1 XK-62-2. Sin embargo, también es evidente que el XK-63-2 es completamente distinto de estos antibióticos por sus valores Rf.

5 La práctica de ciertas realizaciones específicas de esta invención es ilustrada mediante los siguientes ejemplos representativos.

EJEMPLO 1

A. Cultivo de MK-65:

10 En este ejemplo se utiliza Micromonospora sagamiensis MK-65 ATCC 21826 (FERM-P nº 1530) como variedad de siembra. Se inoculan 4 ml de la variedad de siembra en 30 ml de un primer medio de siembra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. El primer medio de siembra tiene la siguiente composición:

15	Dextrina	1 %
	Glucosa	1 %
	Peptona	0,5 %
	Extracto de levadura	0,5 %
	Carbonato cálcico	0,1 %

20 (pH: 7,2 antes de la esterilización).

El cultivo se realiza sacudiendo a 30°C durante 5 días. Después se inoculan 30 ml del cultivo de siembra en 300 ml de un segundo medio de siembra, de la misma composición que el primer medio, en un matraz Erlenmeyer de 2 litros provisto de tabiques. El segundo cultivo de siembra se lleva a 25 cabo sacudiendo a 30°C durante 2 días. Después se inoculan 1,5 l del segundo cultivo de siembra (correspondiente al contenido de 5 matraces) en 15 l de un tercer medio de siembra de la misma composición que los anteriores, en un fermentador 30 vibratorio de vidrio de 30 l. El cultivo en el fermentador vi-





415221

1 una placa de ágar.

5 Las fracciones activas se combinan y concentran a vacío hasta unos 5 l. Después el concentrado se ajusta a pH 8,0 con ácido sulfúrico 6 N y se pasa por una columna rellena con 1 l de una resina cambiadora de anión, Dowex 1x2 (forma OH<sup>-</sup>). La columna se lava con unos 5 l de agua y la sustancia activa se concentra hasta 1/15 de su volumen. El concentrado se ajusta a pH 10,5 con hidróxido sódico 6 N y se añaden cinco volúmenes de acetona. El precipitado resultante se separa por filtración y el filtrado se concentra hasta 500 ml. El concentrado se ajusta a pH 4,5 con ácido sulfúrico 6 N y se añaden 2,5 l de metanol. Después de enfriar, se obtiene un precipitado blanco. El precipitado se separa por filtración y se lava con metanol. Después de secar a vacío, se obtienen unos 300 g de un polvo blanco. Este último es una mezcla del sulfato de gentamicina C<sub>1a</sub> y sulfato de KK-62-2 y presenta una actividad de 620 unidades/mg (la actividad de 1 mg de producto puro corresponde a 1000 unidades).

15 C. Aislamiento y purificación de KK-62-2:

20 Sobre la parte superior de una columna de 5 cm de diámetro por 150 cm, rellena con unos 3 kg de gel de sílice previamente suspendidos en un disolvente formado por cloroformo, isopropanol y amoniacó acuoso (2:1:1 en volumen), se colocan 100 g del polvo blanco obtenido en la etapa B anterior formando una delgada capa uniforme. Después se lleva a cabo la elución con el mismo disolvente a un caudal de unos 250 ml/hora. El eluato se separa en porciones de 100 ml. La fracción activa se somete a cromatografía en papel para examinar los componentes eluidos. El KK-62-2 se eluye en las fracciones 25 30 núms. 53-75 y la gentamicina C<sub>1a</sub> se eluye en las fracciones



415221

1 núms. 85-120. Se combinan las fracciones núms. 53-75 y se con-  
 centran a presión reducida para separar suficientemente el di-  
 solvente. Después el concentrado se disuelve en una pequeña  
 cantidad de agua. Después de liofilizar la solución, se obtie-  
 5 nen alrededor de 38 g de un preparado purificado de KK-62-2  
 (base libre). El preparado tiene una actividad de 950 unida-  
 des/mg. Análogamente se combinan las fracciones núms. 85-120  
 y se concentran a presión reducida para separar suficiente-  
 mente el disolvente. Después el concentrado se disuelve en  
 10 una pequeña cantidad de agua. Una vez liofilizada la solución,  
 se obtienen alrededor de 50 g de un preparado purificado de  
 gentamicina C<sub>1a</sub> (base libre). La actividad del preparado es  
 alrededor de 980 unidades/mg.

EJEMPLO 2

15 En este ejemplo se utiliza Micromonospora saga-  
miensis var. flava Mm 628 ATCC 21827 (FERM-P- nº 1531) como  
 variedad de siembra. El cultivo de siembra se realiza de la  
 misma forma descrita en el Ejemplo 1, utilizando el mismo me-  
 dio de siembra. Se inoculan 60 l del cuarto cultivo de siem-  
 20 bra en 600 l de un medio de fermentación en un fermentador  
 de 1000 l. La composición del medio de fermentación es la si-  
 guiente:

	Almidón soluble	4 %
	Licor de infusión de maíz	1 %
25	Harina de soja	2 %
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05 %
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 %
	KCl	0,03 %
	CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,005 %
30	CaCO <sub>3</sub>	0,1 %

415221



1 La fermentación se lleva a cabo aireando con 600 l/  
minuto y agitando a 150 rpm, a 30°C, durante 96 horas. Una  
vez completada la fermentación, el producto crudo se separa  
del líquido de cultivo en la forma descrita en el Ejemplo 1  
5 para obtener 400 g de un polvo blanco. Como resultado de la  
cromatografía en papel, se encuentra que el polvo contiene  
gentamicina C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>1a</sub> además de XK-62-2.

Los 400 g del polvo blanco se colocan entonces so-  
bre la parte superior de una columna de vidrio cilíndrica, re-  
10 llena uniformemente con unos 8 kg de gel de sílice, que se  
han suspendido previamente en un disolvente formado por clo-  
roformo, isopropanol y amoniaco acuoso al 17 % (2:1:1 en vo-  
lumen). Después de colocar el polvo sobre la parte superior  
de la columna, se realiza la elución con el mismo sistema di-  
15 solvente a un caudal de unos 500 ml/hora. El eluato se separa  
en fracciones de 500 ml. Cada una de las fracciones se some-  
te a cromatografía de papel. Como resultado de ello se encuen-  
tra que cada uno de los componentes es eluído en el siguiente  
orden: gentamicina C<sub>1</sub>, XK-62-2, gentamicina C<sub>2</sub> y gentamicina  
20 C<sub>1a</sub>. Las fracciones que contienen el mismo componente se com-  
binan y concentran. El concentrado se disuelve en agua y se  
liofiliza y se aislan los siguientes componentes en forma de  
base libre.

25	<u>Componente</u>	<u>Actividad unidades/mg</u>	<u>Rendimiento, (g)</u>
	gentamicina C <sub>1</sub>	880	150
	XK-62-2	932	60
	Gentamicina C <sub>2</sub>	925	113
	Gentamicina C <sub>1a</sub>	940	52

30

415 221



1

EJEMPLO 3

En este ejemplo se utiliza Micromonospora sagamiensis var. nonreducans MK-62, ATCC 21803 (FERM-P nº 1477) como variedad de siembra. Se inoculan 4 ml de la variedad de siembra en 30 ml de un primer medio de siembra contenidos en un Erlenmeyer de 250 ml. El medio de siembra está constituido por:

5

10

Dextrina	1 ‰
Glucosa	1 ‰
Peptona	0,5 ‰
Extracto de levadura	0,5 ‰
Carbonato cálcico	0,1 ‰

(pH: 7,2 antes de la esterilización).

15

El cultivo se realiza sacudiendo a 30°C durante 5 días. Después se inoculan 30 ml del cultivo de siembra en 300 ml de un segundo medio de siembra, en la misma composición indicada anteriormente, en un Erlenmeyer de 2 litros provisto de tabiques. El segundo cultivo de siembra se realiza sacudiendo a 30°C durante 2 días. Después se inoculan 1,5 litros del segundo cultivo de siembra (correspondiente al contenido de 5 matraces) en 15 litros de un tercer medio de siembra, de la composición antes indicada, en un fermentador vibratorio de vidrio, de 30 litros.

20

25

El cultivo del fermentador vibratorio se lleva a cabo con aireación (15 l/minuto) y agitación (300 rpm) a 30°C durante 2 días. Después se inoculan 15 l del tercer cultivo de siembra en 60 l de un cuarto medio de siembra de la misma composición indicada, en un fermentador de 300 l. El cultivo en el fermentador se lleva a cabo con una aireación (70 l/minuto) y agitación (150 rpm) a 30°C durante 2 días. Finalmente

30

415221



1 se inoculan 60 l del cuarto cultivo de siembra en 600 l de un medio de fermentación de la siguiente composición, en un fermentador de 1000 l:

5

Dextrina	5 %
Harina de soja	3,5 %
CaCO <sub>3</sub>	0,7 %

(pH: 7,2 antes de la esterilización).

10 El cultivo del fermentador se realiza con aireación (500 l/minuto) y agitación (150 rpm) a 30°C durante 5 días.

15 Una vez completada la fermentación, el líquido de cultivo se ajusta a pH 2,0 con ácido sulfúrico 12 N y se agita durante 30 minutos. Después se añaden unos 10 kg de Radiolite nº 600 y las células microbianas se separan por filtración. El filtrado se ajusta a pH 8,0 con hidróxido sódico 6 N y se pasa por una columna rellena con unos 50 l de una resina cambiadora de catión, Amberlite IRC-50 (forma amónica). El eluato se desprecia. Después de lavar la resina con agua, la sustancia activa se eluye con amoníaco acuoso 1 N. La actividad del eluato así obtenido se determina frente a Bacillus subtilis nº 10707 por un método en disco de papel utilizando una placa de ágar.

20 Las fracciones activas se combinan y concentran a vacío hasta unos 5 l. El concentrado se ajusta a pH 8,0 con ácido sulfúrico 6 N y se pasa por una columna rellena con 1 l de una resina cambiadora de anión, Dowex 1 x 2 (forma OH<sup>-</sup>) y después se lava con unos 5 l de agua para separar las impurezas. La fracción activa se concentra hasta 1/15 de su volumen. El concentrado se ajusta después a un pH de 10,5 con hidróxido sódico 6 N y se añaden 5 volúmenes de acetona. El precipitado resultante se separa por filtración y la capa acetónica se

25

30



1913

415221

1 concentra a 500 ml. El concentrado se ajusta a pH 4,5 con áci-  
do sulfúrico 6 N y se agregan 2,5 l de metanol. Después de  
enfriar, se obtiene un precipitado blanco. El precipitado se  
separa por filtración y se lava con metanol. Después de se-  
5 car a vacío, se obtienen 16-20 g de un polvo blanco. Este  
último es una mezcla del sulfato de gentamicina  $C_{1a}$  y de  
XK-62-2 y presenta una actividad de 550 unidades/mg (la acti-  
vidad de 1 mg de producto puro corresponde a 1000 unidades).

10 Sobre la parte superior de una columna de 25 mm  
de diámetro por 50 cm de longitud, rellena con unos 300 ml  
de gel de sílice que se ha suspendido previamente en una  
mezcla disolvente formada por cloroformo, isopropanol y amo-  
niaco acuoso (2:1:1 en volumen), se coloca una capa uniforme  
y delgada formada por 5 g del polvo blanco. Después se lle-  
15 va a cabo la elución con el mismo disolvente a un caudal de  
unos 30 ml/h. El eluato se separa en porciones de 10 ml. La  
fracción activa se somete a cromatografía de papel para exa-  
minar los componentes eluidos. El XK-62-2 se eluye en las  
fracciones 53-75 y la gentamicina  $C_{1a}$  se eluye en las frac-  
20 ciones 85-120. Se combinan las fracciones 53-75 y se concen-  
tran a presión reducida para separar suficientemente el di-  
solvente. El concentrado se disuelve en una pequeña cantidad  
de agua. Después de liofilizar la solución, se obtienen alre-  
25 dedor de 900 mg de un preparado purificado de XK-62-2 (base  
libre). El preparado tiene una actividad de unas 950 unida-  
des/mg. Análogamente, se combinan las fracciones 85-120 y se  
concentran a presión reducida para separar suficientemente  
el disolvente. El concentrado se disuelve en una pequeña can-  
30 tidad de agua. Después de liofilizar la solución, se obtie-  
nen alrededor de 1,8 g de un preparado purificado de gentami

-31-  
415221



1975

1 cina C<sub>1a</sub> (base libre). La actividad del preparado es alrededor de 980 unidades/mg.

EJEMPLO 4

5 En este ejemplo se utiliza de nuevo Micromonospora sagamiensis var. nonreducans MK-62 (ATCC 21803) como variedad de siembra. La composición del medio de siembra es la siguiente:

	Almidón soluble	2 %
	Amina NZ tipo A	0,5 %
10	Extracto de levadura	0,5 %
	Carbonato cálcico	0,1 %

Se inoculan 4 ml del cultivo de siembra en 300 ml del medio de siembra en un Erlenmeyer de 2 l. El primer cultivo de siembra se realiza sacudiendo a 30°C durante 4 días. Después el contenido de los tres matraces del primer cultivo de siembra se inocula en 15 l de un medio de siembra fresco en un fermentador vibratorio de 30 l. El segundo cultivo de siembra se lleva a cabo con aireación y agitación a 30°C durante 2 días. Después se transfieren 150 l del tercer cultivo de siembra a un tanque de 3000 l que contiene 150 l de un medio de fermentación con la siguiente composición:

	Almidón soluble	4 %
	Licor de infusión de maíz	1 %
	Harina de soja	2 %
25	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05 %
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 %
	KCl	0,03 %
	CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,005 %
	CaCO <sub>3</sub>	0,1 %

30 La fermentación se efectúa aireando y agitando a

415<sup>32</sup>221



1973

1 30°C durante 4 días. La producción de sustancia activa alcanza un máximo al cabo de 4 días de fermentación y la actividad de la sustancia no es reducida durante algún tiempo.

5 Una vez completada la fermentación, el líquido de cultivo se ajusta a un pH de 2,0 con ácido oxálico y se agita durante una hora. De esta forma, la mayor parte de la sustancia activa contenida en las células microbianas es extraída al líquido. Después se añaden 20 kg de un auxiliar de filtración, Celite 545 y las células microbianas y el oxalato  
10 cálcico se separan por filtración. El filtrado se ajusta a pH 6,8 con hidróxido sódico 6 N y se pasa por una columna rellena con unos 100 l de una resina cambiadora de catión, Amberlite IRC-50 (forma sódica). La columna se lava con agua. El efluente y las aguas de lavado contienen las impurezas y  
15 las sustancias que no son absorbidas sobre la resina y que presentan actividad solamente sobre los microorganismos Gram-positivos.

20 La elución se realiza con unos 300 l de ácido sulfúrico 2 N y los componentes activos se recuperan en el eluato, en fracciones. Se combinan las fracciones y se ajustan a pH 7,5 con hidróxido sódico 2 N. La solución resultante se concentra a presión reducida hasta 20 l y el concentrado se ajusta a pH 10,5 con hidróxido sódico 2 N. Se añaden cinco volúmenes de acetona mientras se agita, con lo que se forma un  
25 precipitado que después se separa por filtración y se lava con acetona. Se combinan el filtrado y las aguas de lavado y se concentran bajo presión hasta 1 l. El concentrado se ajusta a pH 4,5 con ácido sulfúrico 6 N. Después se añaden 5 l de metanol con agitación y la mezcla resultante se deja en  
30 reposo en una cámara fría. Se forma así un precipitado blanco

415221



1 que se separa por filtración y se lava con metanol. Al secar  
el precipitado a vacío se obtienen alrededor de 65 g de anti-  
biótico crudo. El polvo crudo es una mezcla del sulfato de  
gentamicina C<sub>1a</sub> y del de XK-62-2 y tiene una actividad de 450  
5 unidades/mg.

Después se disuelven 60 g del polvo crudo así obte-  
nido en 10 l de agua. La solución se ajusta a pH 8,0 con hi-  
dróxido sódico 2 N y se pasa por una columna rellena con 3 l  
de una resina cambiadora de anión, Amberlite IRA-400 (forma  
10 OH<sup>-</sup>). La columna se lava con 10 l de agua y el eluato y las  
aguas de lavado se combinan y concentran hasta 1 l. El concen-  
trado se ajusta a pH 4,5 con ácido sulfúrico 6 N y se añaden  
10 l de metanol. De esta forma se obtienen unos 50 g del sul-  
fato purificado de un antibiótico.

15 Alrededor de 50 g del antibiótico purificado se co-  
locan sobre la parte superior de una columna de 4 cm de diá-  
metro por 100 cm de longitud, rellena con unos 2,8 l de celu-  
losa en polvo. La elución se realiza gradualmente con la ca-  
pa inferior de una mezcla disolvente formada por cloroformo,  
20 metanol y amoníaco al 17 % (2:1:1:). La velocidad de elución  
es comprobada para que no pase de porciones de 100 ml. El  
eulato se separa en porciones de 20 ml y el XK-62-2 y la gen-  
tamicina C<sub>1a</sub> se eluyen independientemente en las fracciones  
62-86 y 95-130, respectivamente. Se combinan las fracciones  
25 de cada uno de los componentes y se concentran a presión redu-  
cida para separar el disolvente y después el concentrado se  
disuelve en una pequeña cantidad de agua. La solución resul-  
tante se ajusta a pH 4,5 con ácido sulfúrico 2 N. Después de  
liofilizar, se obtienen 8,7 g del sulfato de XK-62-2 (792 uni-  
30 dades/mg) y 1,8 g del de gentamicina C<sub>1a</sub> (787 unidades/mg),



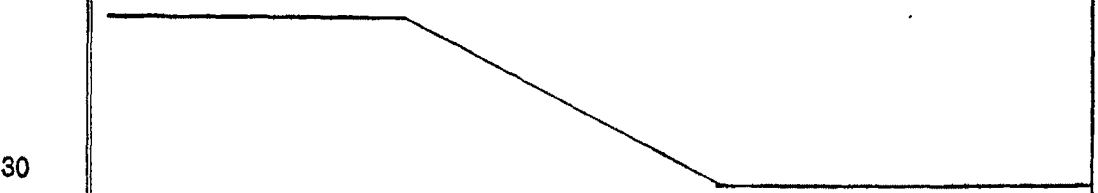
1970

1 ambos en forma de un polvo blanco.

Para preparar la base libre, se disuelven 5 g del sulfato de XK-62-2 en 500 ml. de agua y se pasa a través de una columna recubierta con 70 ml. de una resina cambiadora de anión, Dowex 1 x 2 (forma OH<sup>-</sup>). Después de lavar la columna con 500 ml de agua, el eluato que presenta actividad se concentra bajo presión reducida hasta 100 ml. Después de licuificar el concentrado, se obtienen 3,3 g de una base libre de XK-62-2 (990 unidades/mg).

10 EJEMPLO 5. El cultivo de MK-62-NG-164 se realiza de la misma forma que en el Ejemplo 3, para obtener 956 (750 unidades/mg), de una mezcla de C<sub>1a</sub> y XK-62-2. La mezcla se trata de la misma forma que en la etapa C del ejemplo 1 para proporcionar 49 g de XK-62-2 (975 unidades/mg) y 0,95 g de C<sub>1a</sub> (980 unidades/mg).

15 EJEMPLO 6. En este ejemplo se utiliza Micromonospora purpurea NRRL 2953 como variedad de siembra. El cultivo se realiza en la forma indicada en el Ejemplo 2. De esta manera se obtienen 60 g de un polvo blanco como se describe en la etapa B del Ejemplo 1. Como resultado de la cromatografía en papel, se determina que este polvo contiene cada uno de los siguientes componentes: XK-62-2, gentamicina C<sub>1</sub>, gentamicina C<sub>2</sub> y gentamicina C<sub>1a</sub>. Cada uno de estos componentes es aislado a partir del polvo en forma de base libre, de la manera descrita en el Ejemplo 2. Los resultados son los siguientes:



415 221

25



1	<u>Componente</u>	<u>Actividad (unidades/mg)</u>	<u>Rendimiento (g)</u>
	gentamicina C <sub>1</sub>	821	21
	XK-62-2	925	2
	gentamicina C <sub>2</sub>	880	15
5	gentamicina C <sub>1a</sub>	850	7

EJEMPLO 7

10 En este ejemplo se utilizan como variedades de siembra Micromonospora echinospora ATCC 15837, Micromonospora echinospora var. ferruginea ATCC 15836, NRRL 2995 y Micromonospora echinospora var. pallida ATCC 15838, NRRL 2996. El cultivo se realiza en la forma descrita en el Ejemplo 2 para obtener un polvo blanco que comprende una mezcla de los componentes de cada uno de los líquidos de cultivo en la forma descrita en la etapa B del Ejemplo 1. Después cada uno de estos componentes es aislado en forma de base libre de la manera descrita en el Ejemplo 2.

15 La actividad y el rendimiento de cada una de las fracciones así aisladas son los siguientes:

20		<u>Micromonospora echinospora ATCC 15837</u>		<u>Micromonospora echinospora var. ferruginea NRRL 2995</u>		<u>Micromonospora echinospora var. pallida NRRL 2996</u>	
		<u>actividad (unidades/mg)</u>	<u>rendimiento (g)</u>	<u>actividad (unidades/mg)</u>	<u>rendimiento (g)</u>	<u>actividad (unidades/mg)</u>	<u>rendimiento (g)</u>
	Gentamicina C <sub>1</sub>	906	15	830	13	940	18
25	XK-62-2	898	3	912	1,5	925	2,5
	Gentamicina C <sub>2</sub>	845	12	853	8	859	7,5
	Gentamicina C <sub>1a</sub>	880	9	920	5,8	890	11

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

415 221<sup>-36-</sup>



REIVINDICACIONES

1

1.- Un procedimiento para la producción del antibiótico XK-62-2 con un peso molecular de 463, una fórmula molecular de  $C_{20}H_{41}N_5O_7$  y caracterizado por

5

(a) un espectro de absorción ultravioleta esencialmente como el mostrado en la Figura 1;

(b) un espectro de absorción infrarrojo esencialmente como el mostrado en la Figura 2 y

10

(c) un espectro de resonancia magnética nuclear esencialmente como el mostrado en la Figura 3;

caracterizandose el procedimiento porque comprende cultivar un microorganismo perteneciente al género Micromonospora, que es capaz de producir XK-62-2, en un medio nutritivo; acumular el antibiótico XK-62-2 en el líquido de cultivo; y después aislar del mismo el antibiótico XK-62-2.

15

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho microorganismo es uno que pertenece a la especie Micromonospora sagamiensis.

20

3.- Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho microorganismo es Micromonospora sagamiensis ATCC 21826.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho microorganismo es Micromonospora sagamiensis var. flava ATCC 21827.

25

5.- Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho microorganismo es Micromonospora sagamiensis var. nonreducans ATCC 21803.

*[Handwritten signature]*  
30

6.- Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho microorganismo es Micromonospora sagamiensis var. nonreducans ATCC 21949.



415221

1

7.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho microorganismo es uno que pertenece a la especie Micromonospora echinospora.

5

8.- Un procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho microorganismo es Micromonospora echinospora ATCC 15837.

9.- Un procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho microorganismo es Micromonospora echinospora var. ferruginea ATCC 15838.

10

10.- Un procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho microorganismo es Micromonospora echinospora var. pallida ATCC 15838.

15

11.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho microorganismo es uno que pertenece a la especie Micromonospora purpurea.

12.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho microorganismo es Micromonospora purpurea ATCC 15835.

20

13.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque incluye la etapa adicional de extraer el antibiótico de las células microbianas antes de dicha etapa de aislamiento.

25

14.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho cultivo se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 25°C y 55°C y a un pH aproximadamente neutro.

15.- Se reivindica por último como objetos sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO XK-62-2-

*Be*  
30



1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de treinta y ocho páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

5

Madrid, 25 de Mayo de 1.973

BERNARDO UNGRIA  
D. P.

A large, stylized handwritten signature in dark ink, written over the typed name "BERNARDO UNGRIA". The signature is cursive and somewhat abstract.

10

15

20

25

A handwritten signature in dark ink, located at the bottom left of the page. Below the signature is the number "30".

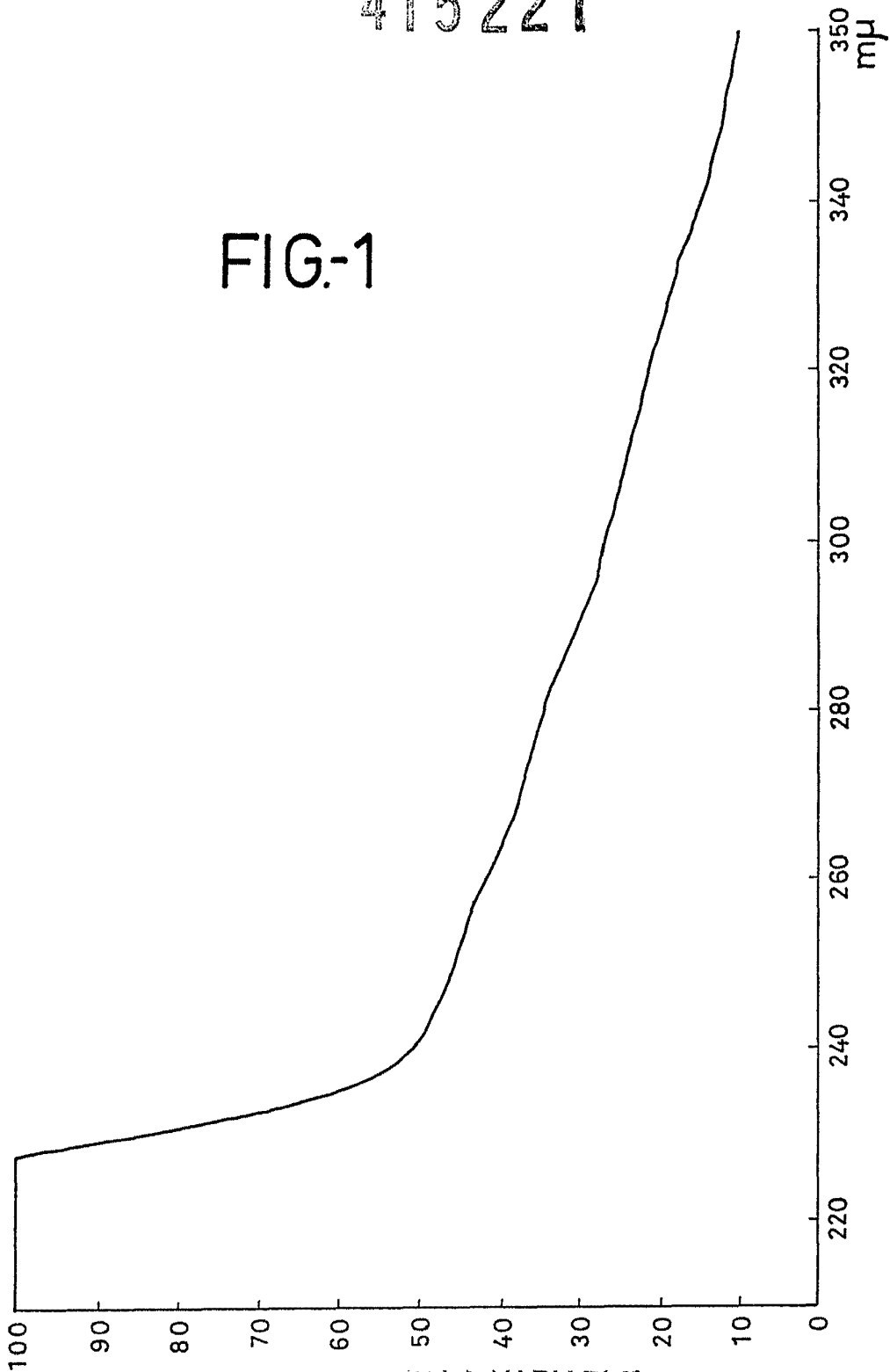
30

No 415.221



415 221

FIG-1



ESCALA VARIABLE  
MADRID, 25 DE mayo DE 19 73  
BERNARDO UNGRÍA  
P. P.

1. ABBOTT LABORATORIES  
2. KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

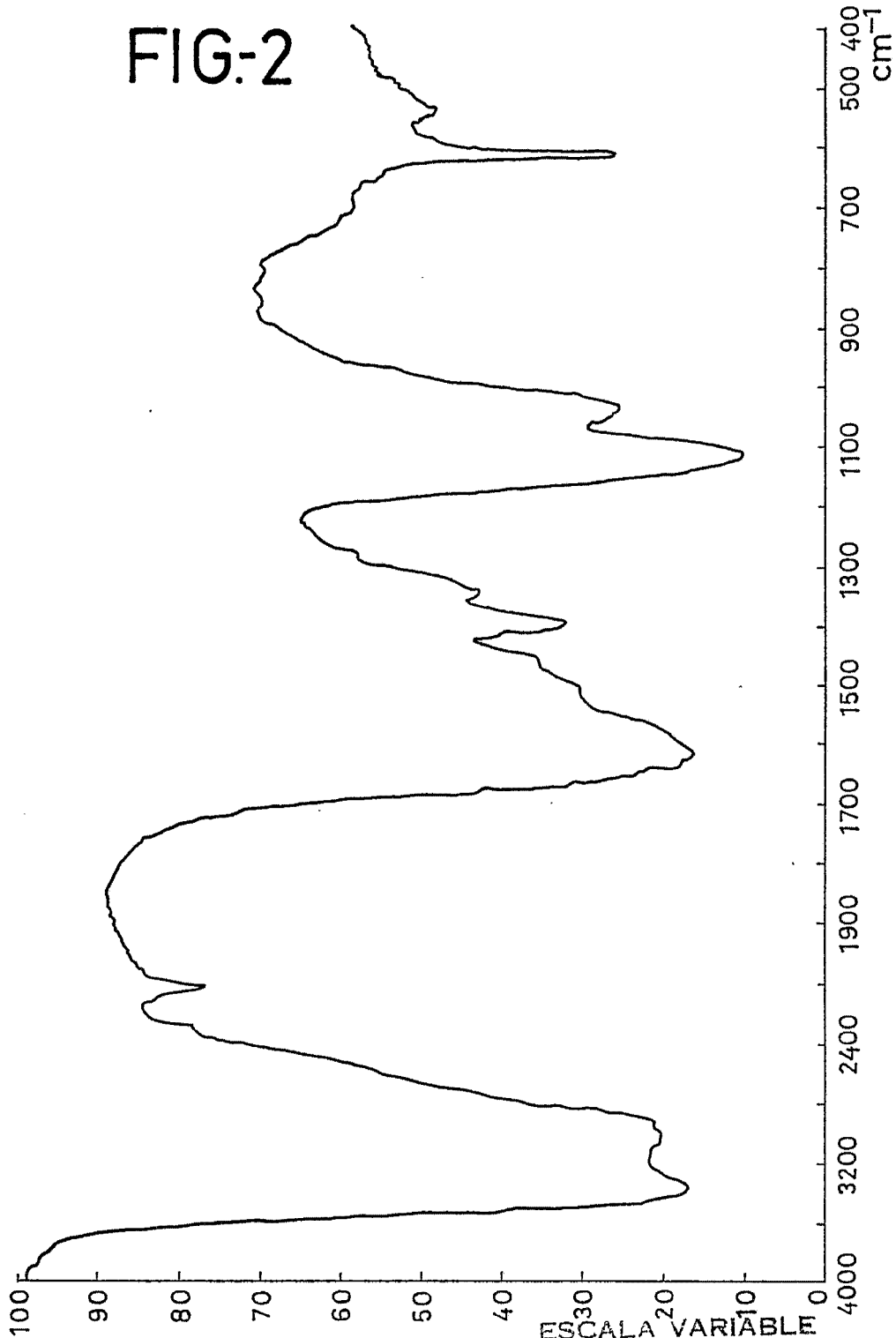
TRES HOJAS/2

415 221

Nº 415.221



FIG-2



ESCALA VARIABLE

MADRID, 25 DE mayo DE 19.73

BERNARDO UNGRÍA  
P. P.

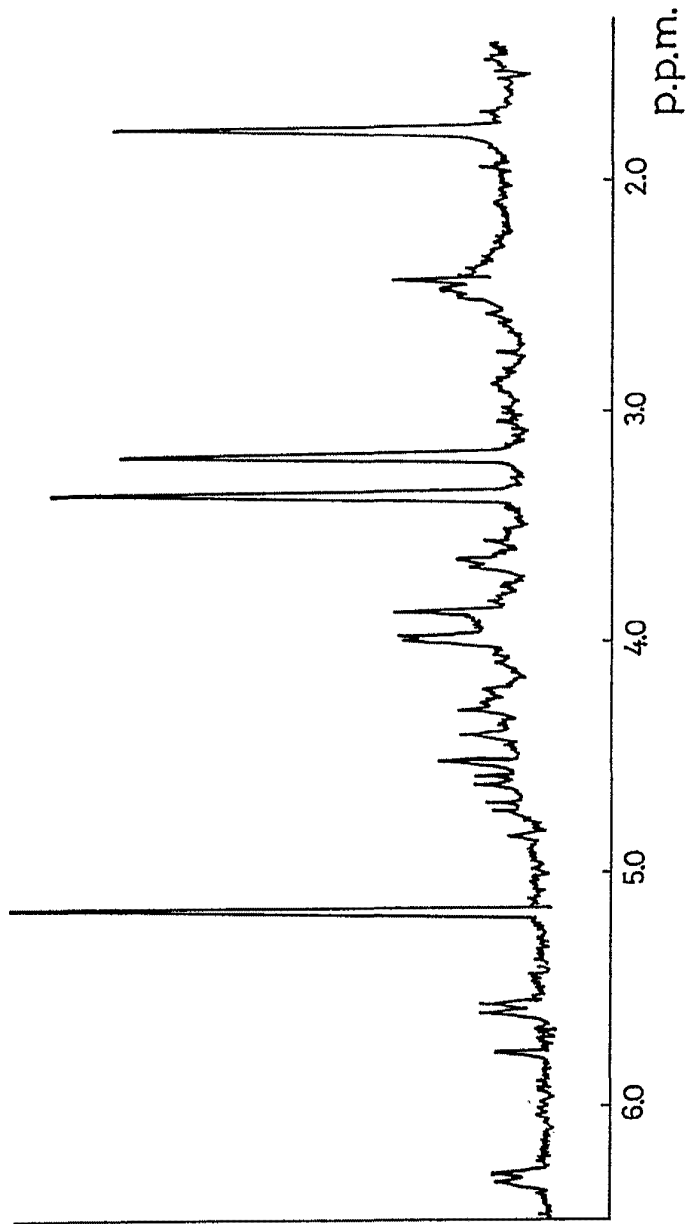
415221

NR 415.221

22



FIG-3



MALANG, 25 DE mayo 1973  
P. B.

*[Handwritten signature]*