

Int. Cl. C12D//A61K

REF: CASE 155-17

- 8 FEB. 1977

CONCEDIDA

431.332

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

RESIDENCIA: 6-1, Ohtemachi Itchome, Chiyoda-ku,  
TOKYO, Japón.

ENUNCIADO: UN METODO PARA PRODUCIR COMPUESTOS  
ANTIBIOTICOS.

Prioridad: Patente japonesa n.º 118932/73 del 24-10-1973

OF.

1     EXTRACTO DE LA INVENCION:

5     Se obtiene una nueva serie de antibióticos de signados como serie XK-88 por cultivo de un microorganismo que pertenece al género Streptomyces en un medio nutriente y posterior recuperación del antibiótico del líquido de cultivo.

10    ANTECEDENTES DEL INVENTO

15    La presente invención se refiere a nuevos antibióticos y a un procedimiento de producción de los mismos. Más específicamente la presente invención se refiere a nuevos antibióticos designados como XK-88-1, XK-88-2, XK-88-3 y XK-88-5 y a un nuevo procedimiento para producir tales antibióticos.

20    Siempre hay demanda de antibióticos que exhiban actividad frente a un amplio espectro de bacterias. Con este fin, se ha aislado una nueva especie de microorganismo del suelo en las localidades de Tajima-cho, Hofu-shi, Yamaguchi-ken, Japón. Estas nuevas especies, cuando se cultivan, producen una serie de nuevos antibióticos, la serie XK-88, todos los cuales presentan una fuerte actividad antibacteriana frente a diversas bacterias gram-positivas y gram-negativas. Según esto, los antibióticos de la invención son útiles para limpiar y esterilizar material de laboratorio e instrumentos quirúrgicos, y se pueden emplear también en combinación con diversos jabones con propósitos sanitarios como en limpieza y saneamiento de salas de hospitales y locales utilizados para preparación de alimentos.

25    BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

30    La Fig. 1 representa el espectro de absorción en el ultravioleta del sulfato de XK-88-1;

1

La Fig. 2 representa el espectro de absorción en el infrarrojo del sulfato de XK-88-1;

La Fig. 3 representa el espectro de absorción en el ultravioleta del sulfato de XK-88-2;

5

La Fig. 4 representa el espectro de absorción en el infrarrojo del sulfato de XK-88-2;

La Fig. 5 representa el espectro de absorción en el ultravioleta del sulfato de XK-88-3;

10

La Fig. 6 representa el espectro de absorción en el infrarrojo del sulfato de XK-88-3;

La Fig. 7 representa el espectro de absorción en el ultravioleta del sulfato de XK-88-5;

La Fig. 8 representa el espectro de absorción en el infrarrojo del sulfato de XK-88-5;

15

La Fig. 9 representa el espectro de RMN de la base libre de XK-88-1;

La Fig. 10 representa el espectro de RMN de la base libre de XK-88-2;

20

La Fig. 11 representa el espectro de RMN de la base libre de XK-88-3;

La Fig. 12 representa el espectro de RMN de la base libre de XK-88-5;

25

La Fig. 13 representa el espectro de RMN-C<sup>13</sup> de la base libre de XK-88-1;

La Fig. 14 representa el espectro de RMN-C<sup>13</sup> del sulfato de XK-88-2; y

La Fig. 15 representa el espectro de RMN-C<sup>13</sup> del sulfato de XK-88-5.

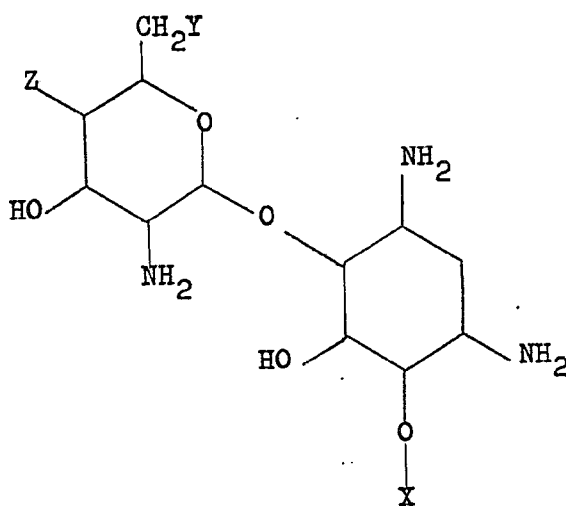
30

RESUMEN DE LA INVENCION

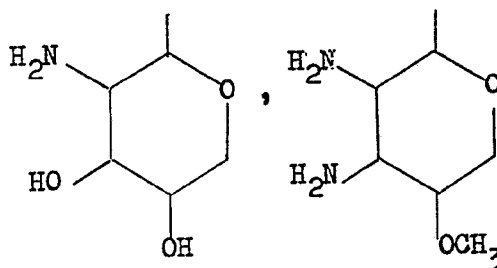
De acuerdo con la presente invención se produ

1 ce una nueva serie de antibióticos relacionados XK-88-1,  
XK-88-2, XK-88-3 y XK-88-5, por cultivo de un microorganis-  
mo, perteneciente al género Streptomyces, que es capaz de  
5 producir los antibióticos, en un medio nutriente hasta que  
se detecta una actividad antibacteriana sustancial en el lí-  
quido de cultivo. Cuando el cultivo se completa, se recupe-  
ran los antibióticos respectivamente como fracciones acti-  
vas por tratamiento con resinas de intercambio iónico y pos-  
10 teriormente se aíslan como sustancias purificadas por los  
métodos convencionales empleados en aislamiento y purifica-  
ción.

Se puede considerar que los nuevos antibióti-  
cos de la presente invención tienen la siguiente fórmula ge-  
neral:



donde X representa



ó -H; Y representa -NH<sub>2</sub> ó -OH, y es -NH<sub>2</sub> cuando X es -H; y

Z representa -H ó -OH, y es -H cuando X es -H.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Se producen antibióticos de la serie XK-88 por cultivo de un microorganismo que pertenece al género Streptomyces. Un microorganismo particularmente adecuado es el que pertenece a Streptomyces hofuensis que se ha determinado como una nueva especie no identificada hasta ahora. Esta estirpe típica se identificó originalmente como Streptomyces sp MK-88. Esta estirpe se depositó en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland y se registró con el número de admisión ATCC 21970. La estirpe se ha depositado también en el Fermentation Research Institute, Japan, y se le ha asignado el número de registro FERM-P No 2216. La estirpe MK-88 se caracteriza por las siguientes propiedades:

I. Morfología:

Generalmente, la estirpe MK-88 es pobre en crecimiento. De los ocho tipos de medios presentados en la Tabla 1, a continuación, la estirpe MK-88 solo muestra un crecimiento moderado en tres medios, es decir, en agar de harina de avena, agar de almidón y extracto de levadura-agar de extracto de malta. En los demás medios, la estirpe presenta sólo un ligero crecimiento. La formación de un micelio aéreo es pobre y se forma un micelio aéreo blanco sólo sobre sacarosa, agar de nitrato, agar de almidón y extracto de levadura- agar de extracto de malta. El micelio aéreo presenta ramificación sencilla. El esporoforo es recto, o flexuoso, y la parte superior de los esporoforos algunas veces forma un bucle pero nunca forma una espiral. Frecuentemente se forman más de 10 esporas con una superficie averru-

1 gada o espinosa en el extremo del esporoforo.

II. Características del cultivo:

5 En la Tabla I se reúnen el grado de crecimiento y características adicionales observadas cuando se cultiva una estirpe MK-88 sobre diversos medios. Las indicaciones de color se dan de acuerdo con las clasificaciones del Color Harmony Manual, 4ª edición (Container Corporation of America), Las características se determinan después de un cultivo a 30°C durante 2 semanas.

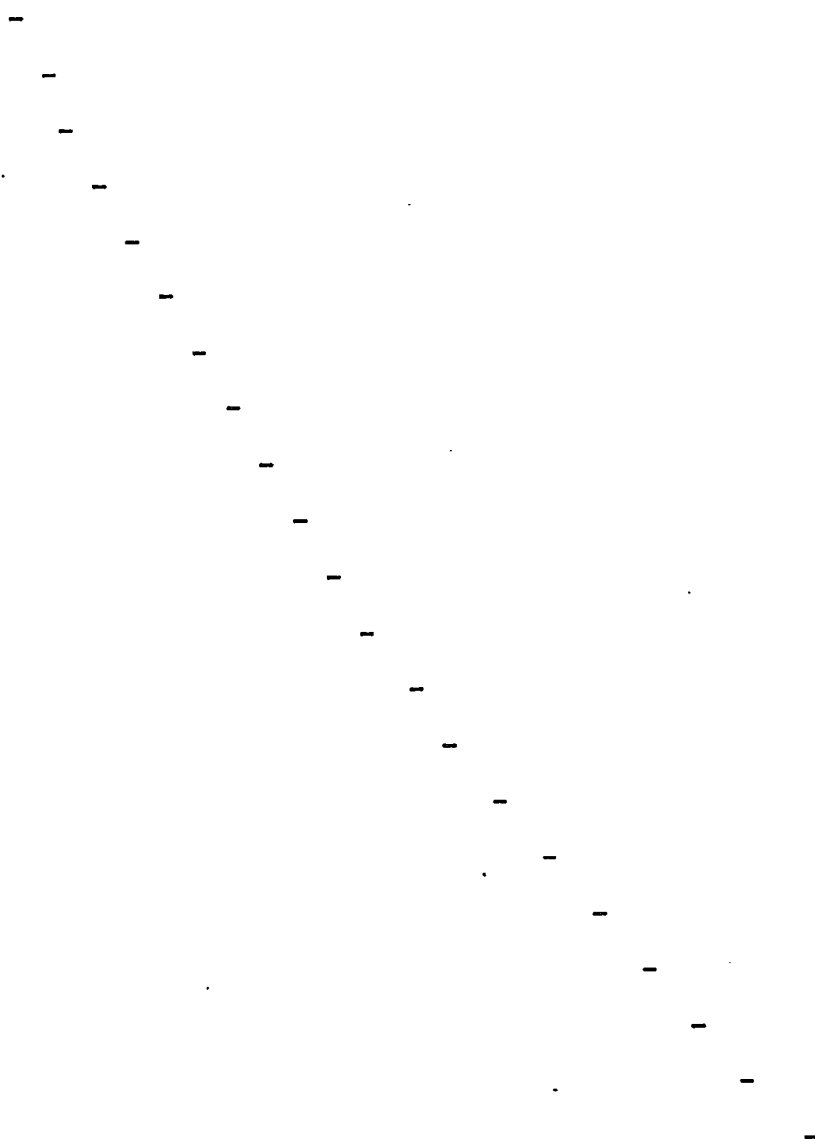
10

15

20

25

30



1

TABLA 1

Crecimiento en distintos medios

	Medio	Creci- miento	Micelios sustrato	Formación de micelios aéreos	Micelios aéreos	Pigmen- tos solu- bles
5	Sacarosa Nitrate agar	Pobre	Incoloro a crema (1-1/2 ca)	Pobre	Blanco (a)	Ninguno
	Glucosa Aspara- guina agar	Pobre	Incoloro a crema (1-1/2 ca)		Ninguno	Ninguno
10	Nutrien- te agar	Pobre	Incoloro a arce amarillo (3ng)		Ninguno	Ninguno
	Agar Avena	Mode- rado	Oro mosta- za (2 pg) a pardo mostaza claro (2 ie)		Ninguno	Ninguno
15	agar Almidón	Mode- rado	Gamuza bambú (2 gc)	Pobre	Blanco (a)	Ninguno
	Tirosi- na agar	Pobre	Incoloro a arce amarillo (3 ng)		Ninguno	Ninguno
20	Extrac- to de levadura. Agar de extracto de malta	Mode- rado	Arce ama- rillo (3 ng)	Pobre	Blanco (a)	Ninguno
25	Glicer- ina agar Asparagui- na	Pobre	Incoloro a cáscara de huevo marfil claro (2 ca)		Ninguno	Ninguno
30						

1 Como se ve en la anterior Tabla 1, los micelios sustrato son incoloros o color crema a pardo, los micelios aéreos son blancos y no se producen pigmentos solubles sobre ninguno de los medios.

5 **III. Propiedades Fisiológicas:**

Temperatura de crecimiento:	26 a 43°C
Licuefacción de gelatina:	Negativa
Hidrólisis de almidón:	Positiva
Coagulación y peptonización de leche desnatada:	Negativa
Formación de pigmentos melanoides:	No se forman pigmentos sobre el medio de agar tirosina y medio de peptona-levadura-agar hierro.

10

**IV. Utilización de fuentes de carbono:**

	<u>Fuente de carbono</u>	<u>Utilización</u>
15	D-Glucosa	++
	Sacarosa	++
	Manita	++
	D-xylosa	++
20	L-Ramnosa	++
	D-Arabinosa	±
	Inosita	-
	D-Fructosa	-
	D-Rafinosa	-

25

Estirpes de especies caracterizadas por las propiedades que se dan a continuación se han investigado en The Actinomycetes Vol. 2 S.A. Waksman, The Williams and Williams Co., 1961 y en International Journal of Systematic Bacteriology Vol. 18 No 2 p 69-189, Vol. 18 No 4 p 279-392, Vol. 19 No 4 p 391-512, Vol. 22 No 4 p 265-394: ramifica-

30

1 ción sencilla; sin formación de pigmentos melanoides ni -  
pigmentos solubles; esporoforo recto, flexuoso ó a bucles;  
superficie de esporas verrugosa o espinosa; micelio aéreo  
5 blanco; micelio de sustrato incoloro o pardo amarillento  
sin exhibir nunca ningún otro color claramente. Como resul-  
tado, se ha determinado que la estirpe MK-88 es similar a  
las estirpes de Streptomyces craterifer y Streptomyces -  
bluensis, particularmente, las estirpes de la primera espe-  
cie. Sin embargo, la estirpe MK-88 tiene propiedades dife-  
10 rentes de las dos especies antes mencionadas como se ve en  
las siguiente Tabla 2.

15

20

25

30

Tabla 2

	<u>S. craterifer</u>	<u>S. bluensis</u>	<u>MK-88</u>
1			
5	El esporoforo raramente forma espiral	El esporoforo raramente forma espiral	El esporoforo no forma espiral bajo las mismas condiciones de cultivo que las de las dos estirpes de <u>S. craterifer</u> y <u>S. bluensis</u>
10	Micelio aéreo formado sobre medio de agar de harina de avena y glicerina-medio de agar asparaguina	Micelio aéreo formado sobre medio de agar de harina de avena y glicerina-medio de agar asparaguina	No se forma micelio aéreo sobre medio de agar de harina de avena y glicerina-medio de agar asparaguina
15		El micelio aéreo se colorea a veces de azul sobre medio de extracto de levadura-agar de extracto de malta	El micelio aéreo se colorea de blanco sobre medio de extracto de levadura-agar extracto de malta
20		Utiliza inosita fructosa y rafinosa	No utiliza inosita, fructosa ni rafinosa

20 Sobre la base de las observaciones anteriores, se considera la estirpe MK-88 como perteneciente a una nueva especie y a esta especie se le ha llamado Streptomyces hofuensis por el nombre del lugar donde se ha aislado la estirpe.

25 Como ocurre con otras estirpes de Actinomyces, el microorganismo útil para llevar a cabo la presente invención se puede mutar por medios artificiales tales como por irradiación ultravioleta, irradiación con  $CO^{60}$ , irradiación con rayos X y por la acción de diversas sustancias químicas inductoras de mutación. Según esto, cualquier es-

30

1 tirpe, incluyo mutada de esta forma, se considera como apropiada para la presente invención en tanto que tenga la capacidad de producir cualquiera o todos los antibióticos de la serie XK-88.

5 En general, los métodos convencionales para el cultivo de microorganismos de los Actinomycetos se pueden utilizar en el procedimiento de la presente invención. Se pueden emplear diversas fuentes de nutrientes para un medio de cultivo. Como fuente de carbono se pueden utilizar  
10 solas o en combinación, glucosa, almidón, mannososa, sacarosa, melazas, aceite vegetal, etc. Además se pueden utilizar como fuente de carbono hidrocarburos, alcoholes, ácidos orgánicos, etc. dependiendo de la capacidad de utilización que posea el microorganismo. Se pueden utilizar, solas o en  
15 combinación, fuentes de nitrógeno orgánicas o inorgánicas tales como cloruro amónico, sulfato amónico, urea, nitrato amónico, nitrato sódico, etc. y fuentes naturales de nitrógeno tales como peptona, extracto de malta, extracto de levadura, levadura seca, infusión de maíz, polvo de soja, proteína vegetal soluble, ácido de cas, etc. Además se pueden  
20 añadir al medio, si fuera necesario, sales inorgánicas tales como cloruro sódico, cloruro potásico, carbonato cálcico, fosfatos, etc. Además se pueden añadir al medio materiales orgánicos o inorgánicos capaces de promover el crecimiento del microorganismo particular e incrementar así la  
25 producción del antibiótico de la invención.

El más adecuado para el procedimiento de la invención es un método líquido de cultivo especialmente un método de cultivo de agitación sumergida. Es deseable llevar a cabo el cultivo a temperatura de 26 a 43°C y a pH  
30

1 aproximadamente neutro. Después de 2 a 15 días de cultivo  
se forman antibióticos de la serie XK-88 acumulándose en el  
líquido de cultivo. Cuando el rendimiento de antibiótico  
5 XK-88 en el líquido de cultivo alcanza un máximo, se detie-  
ne el cultivo y se aísla y purifica el producto deseado del  
líquido de cultivo después de haber sacado las células del  
microorganismo por ejemplo por filtración.

10 El aislamiento y purificación del antibióti-  
co XK-88 del filtrado se lleva a cabo según los métodos  
utilizados corrientemente para aislamiento y purificación  
de los productos metabólicos del microorganismo del líqui-  
do de cultivo.

15 Ya que los miembros de la serie XK-88 son bá-  
sicos y con buena solubilidad en agua, pero poco solubles  
en los disolventes orgánicos ordinarios, los productos de-  
seados pueden purificarse por métodos utilizados normalmen-  
te para la purificación de los llamados antibióticos básic-  
cos solubles en agua. Más específicamente los miembros de  
20 las series XK-88 pueden ser purificados por una combina-  
ción apropiada de absorción y desorción de las resinas de  
intercambio catiónico y carbón activo; cromatografía de co-  
lumna utilizando celulosa; absorción y desorción de colum-  
na LH-20 de Sephadex (nombre comercial, producido por Phar-  
macia Fine Chemicals Inc., Suecia); cromatografía en gel de  
25 sílice; y otros métodos semejantes.

30 Por ejemplo, el filtrado de cultivo exento de  
células se ajusta primero a un pH 7,5 y después se somete a  
absorción sobre una resina de intercambio catiónico, Am-  
berlite (nombre comercial, producida por Rohm and Haas Co.  
U.S.A.) IRC-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavado con agua, se

1 lleva a cabo la elución con amoníaco acuoso 0,5N. Se con-  
centra la fracción activa a presión reducida. Se ajusta en-  
tonces el concentrado a pH 7,5 y se pasa a través de una co-  
luna rellena con carbón activo. Se lava la columna con una  
5 pequeña cantidad de agua y se eluye después con ácido sul-  
fúrico 0,5N. Las impurezas coloreadas son escasamente elui-  
das. Se ajusta el eluato a pH 7,0 con Dowex (nombre comer-  
cial, producido por la Dow Chemical Co. U.S.A.) 44 (forma  
OH<sup>-</sup>) y se pasa a través de una columna de Amberlite CG-50  
10 (forma NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Después de lavar con agua, se lleva a cabo la  
elución con amoníaco acuoso 0,2N.

Resalta, pues, que el compuesto XK-88-1 se elu-  
ye primero, seguido por el componente XK-88-3 y después el  
componente XK-88-5. El componente XK-88-2 puede ser des-  
15 pués eluido con amoníaco acuoso 0,5N.

Se concentra la fracción que contiene XK-88-1  
como principal componente. El concentrado pasa a través de  
una columna de gel de sílice. La elución se lleva a cabo  
con metanol acuoso al 50%. Las fracciones que contienen sus-  
20 tancia activa y que presentan valores R<sub>f</sub> de 0,58 y 0,31 en  
cromatografía de capa fina en gel de sílice empleando reve-  
lador II (metanol y acetato de amonio acuoso al 10% (1:1) y  
revelador M [n-butanol, etanol, cloroformo y amoníaco acuo-  
so al 17% (4:5:2:5)] respectivamente se combinan y concen-  
25 tran. Se ajusta el concentrado a pH 7,5 y se hace pasar en-  
tonces a través de una columna de Amberlite CG-50 (forma  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Después de lavar con agua, se lleva a cabo la elución  
con amoníaco acuoso 0,2N. Se concentran las fracciones acti-  
vas y se ajusta el concentrado a un pH de 4,5 con ácido sul-  
30 fúrico. Se añade a ello metanol con lo que se obtiene un

1 polvo blanco de sulfato de XK-88-1.

Se concentran las fracciones que contienen XK-88-3 y XK-88-5 como componentes principales. El concentrado se pasa a través de una columna de gel de sílice.

5 Cualquier contaminación por el componente XK-88-1 se elimina primero por elución con metanol acuoso al 50%. Entonces se eluye el componente XK-88-3 que presenta valores de Rf de 0,39 y 0,27 respectivamente en cromatografía de capa fina con gel de sílice utilizando revelador II y revelador M,

10 con una mezcla de metanol y acetato de amonio acuoso al 10% (1:1). El componente XK-88-5 (Rf 0,20 y Rf 0,50 en cromatografía en capa fina con gel de sílice utilizando revelador II y revelador M, respectivamente) se eluye con éxito. La fracción activa que contiene XK-88-3 como componente principal

15 y la fracción que contiene XK-88-5 como componente principal pasan respectivamente a través de una columna de Amberlite CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavar con agua, se lleva a cabo la elución con amoníaco acuoso 0,5N. Cada una de las fracciones activas se concentra y pasa a través de una

20 columna de gel de sílice. Por realización de la elución con una mezcla disolvente de n-butanol, etanol, cloroformo, amoníaco acuoso al 17% (4:5:2:5) se obtienen respectivamente la fracción activa que contiene XK-88-3 como componente único y la fracción activa que contiene XK-88-5 como componente

25 único. Cada una de las fracciones activas se concentra y pasa a través de una columna de Amberlite CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavar con agua, se lleva a cabo la elución con amoníaco acuoso 0,5N. Cada una de las fracciones activas se concentra y ajusta a pH de 4,5 con ácido sulfúrico.

30 A ello se añade metanol, con lo que se obtiene respectiva-

1 mente un polvo blanco del sulfato de XK-88-3 y del sulfato  
de XK-88-5.

5 Se concentra la fracción activa que contiene XK-88-  
2 como principal componente. El concentrado se hace pasar a -  
través de una columna de gel de sílice. La elución se lleva a  
cabo con una mezcla de metanol y acetato amónico acuoso al -  
10 10% (1:1). Como resultado se obtiene la fracción que contiene  
XK-88-2 que presenta valores Rf de 0,45 y 0,38 en cromatogra-  
fía de capa fina de gel de sílice utilizando revelador II y  
revelado M, respectivamente. Se hace pasar la fracción activa  
a través de una columna de Amberlite CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Después  
de lavar con agua, se lleva a cabo la elución con amoníaco acuoso  
0,5 N. La fracción activa eluida se concentra y pasa a través  
de una columna de gel de sílice. Por realización de la elución  
15 con una mezcla disolvente de n-butanol, etanol, cloroformo y  
amoníaco acuoso al 17% (4:5:2:5) se obtiene la fracción acti-  
va que contiene XK-88-2 como componente único. La fracción -  
activa se concentra y ajusta a pH 7,5. El concentrado se pasa  
entonces a través de una columna de Amberlite CG-50 (forma -  
20  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavar con agua, se lleva a cabo la elución  
con amoníaco acuoso 0,5N. La fracción activa eluida se concen-  
tra y ajusta a pH 4,5 con ácido sulfúrico. Se añade a ello me-  
tanol con lo que se obtiene un polvo blanco de sulfato de XK-  
88-2.

25 Cuando existen impurezas coloreadas en un componen-  
te XK-88 o en una mezcla de componentes, se puede llevar a ca-  
bo la decoloración por tratamiento con un carbón activo granu-  
lado, una resina porosa tal como Diaion HP-10 (nombre comer-  
cial, producida por Mitsubishi Kasei Co., Ltd. Japón) y Amberlite  
30 XAD-2 y una resina cambiadora de anión como Dowex 1x2 (forma

1 OH<sup>-</sup>). Más específicamente, se pasa una solución acuosa de un  
miembro de la serie XK-88 o una mezcla de ellos, que contie  
ne impurezas coloreadas, a través de una columna de Diaion  
HP-10. Por realización de la elución con agua, puede obte-  
5 nerse una solución acuosa de un miembro de XK-88 o una mez-  
cla de ellos exento de impurezas coloreadas.

Durante la etapa de purificación mencionada  
antes, se observa el comportamiento de los miembros de la  
serie XK-88 por cromatografía en capa fina ascendente en una  
10 placa de gel de sílice utilizando reveladores II [metanol y  
acetato de amonio acuoso al 10% (1:1)] y M [n-butanol, eta  
nol, cloroformo y amoniaco acuoso al 17% (4:5:2:5)]. El re  
velado se lleva a cabo a la temperatura ambiente durante 3  
a 4 horas. Los valores R<sub>f</sub> de XK-88-1, -2, -3 y -5 en el cro  
15 matograma en capa fina se dan en la Tabla 3, que se da más  
adelante.

#### LOS ANTIBIOTICOS

##### XK-88-1

20 El sulfato de XK-88-1 es un polvo cristalino,  
blanco. El punto de fusión del sulfato es 200-240°C (descom  
posición). La rotación óptica del sulfato es  $[\alpha]_D^{28} = +77,9^\circ$   
(C = 1,08, H<sub>2</sub>O). Como resultado de la medida de un espectro  
de masas de alta resolución, se determina que el XK-88-1  
(base libre) tiene un peso molecular de 454 y una fórmula  
25 molecular de C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>. Un análisis elemental del sulfa-  
to de XK-88-1 revela: C = 29,35%, H = 6,48%, N = 8,35% (Calcu-  
lado para C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>·2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O: C = 29,23%, H = 6,35%,  
N = 8,02%).

30 El espectro de absorción en el ultravioleta  
de una solución acuosa de sulfato de XK-88-1 (Fig. 1) reve-

1 la que no existe ningún máximo de absorción característico  
entre 220-360  $\mu$  sino que sólo presenta una absorción termi-  
nal. El espectro de absorción en el infrarrojo del mismo  
(como tableta de KBr) se muestra en la Fig. 2. Como se dedu-  
5 ce de la figura, el XK-88-1, presenta un pico en las si-  
guientes longitudes de onda expresadas en centímetros reci-  
procos ( $\text{cm}^{-1}$ ):

3355, 2900, 2000, 1610, 1505, 1120,  
1025, 615

10 La Fig. 9 representa el espectro RMN (protón)  
característico de la base libre del XK-88-1. La Fig. 13, por  
otro lado, representa el espectro de RMN -  $\text{C}^{13}$  de la base -  
libre de XK-88-1.

15 Con respecto a los ensayos de color, el sulfa-  
to de XK-88-1 da reacciones positivas en el ensayo de ninhi-  
drina y ensayo de Rydon-Smith (H.N. Rydon, Nature 169, 922,  
1952) y da reacciones negativas en el ensayo de Sakaguchi,  
ensayo de maltol, ensayo de cloruro férrico, ensayo Fehling  
y prueba de biuret.

20 El sulfato de XK-88-1 es muy soluble en agua,  
poco soluble en metanol y etanol e insoluble en disolventes  
orgánicos tales como acetona, acetato de etilo, eter etili-  
co, cloroformo, etc.

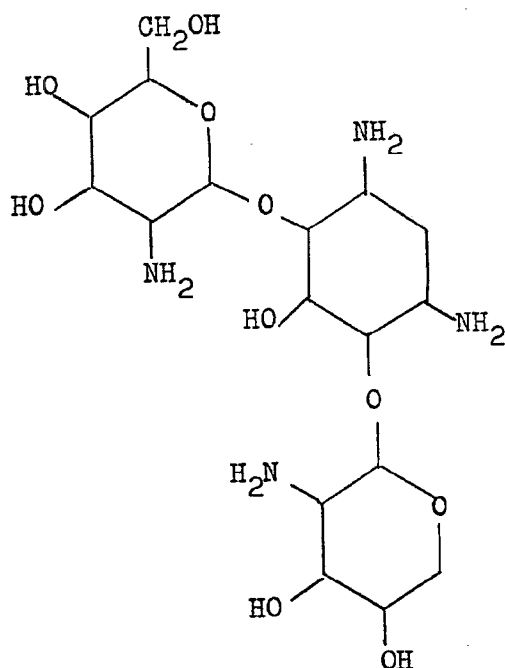
25 Basado sobre lo anterior, se cree que la estruc-  
tura química del XK-88-1 es la siguiente:

-

-

-

-



XK-88-2

El sulfato de XK-88-2 es un polvo blanco. El punto de fusión del sulfato es 225-250°C (descomposición). La rotación óptica del sulfato es  $[\alpha]_D^{28} = +74,7^\circ$  (C = 0,56, H<sub>2</sub>O). Como resultado de la medida de un espectro de masas de alta resolución, se determina que XK-88-2 (base libre) tiene un peso molecular de 306 y una fórmula molecular de C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>. El análisis elemental del sulfato de XK-88-2 revela: C = 25,47%, H = 6,76%, N = 9,68% (Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>·2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O: C = 25,90%, H = 6,52%, N = 10,07%).

El espectro de absorción ultravioleta de una solución acuosa de sulfato de XK-88-2 (Fig. 3) no revela ningún máximo de absorción característico entre 220-360 mμ, sino que solamente presenta absorción terminal. El espectro de absorción infrarrojo del sulfato de XK-88-2 (como tableta de KBr) se representa en la Fig. 4. Como se deduce de la figura XK-88-2 muestra picos en las longitudes de ondas siguientes expresadas en centímetros recíprocos (cm<sup>-1</sup>):

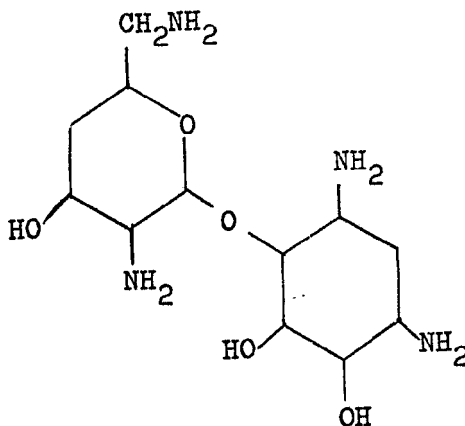
3400, 3000, 1605, 1490, 1115,  
1035, 605

Las características de XK-88-2 se confirman además por el espectro de RMN -  $C^{13}$  del sulfato y por el espectro de RMN de la base libre como se representa en las Figs. 14 y 10 respectivamente.

Con respecto a los ensayos de color el sulfato de XK-88-2 da reacciones positivas en el ensayo de ninhidrina y ensayo de Rydon-Smith y da reacciones negativas en el ensayo de Sakaguchi, ensayo de maltol, ensayo de cloruro férrico, ensayo de Fehling y ensayo de biuret.

El sulfato de XK-88-2 es muy soluble en agua, poco soluble en metanol y etanol e insoluble en disolventes orgánicos tales como acetona, acetato de etilo, éter etílico, cloroformo, etc.

Basado en lo anterior, se cree que la estructura química del XK-88-2 es la siguiente:



XK-88-3

El sulfato de XK-88-3 es un polvo blanco. El punto de fusión del sulfato es 215-240°C (descomposición). La rotación óptica del sulfato es  $[\alpha]_D^{28} = +87,3^\circ$  (C = 0,53,  $H_2O$ ). Como resultado de la medida de un espectro de masas

1 de alta resolución, se determina que XK-88-3 (base libre)  
tiene un peso molecular de 453 y una fórmula molecular de  
 $C_{17}H_{35}N_5O_9$ . El análisis elemental del sulfato de XK-88-3  
5 revela: C = 26,02%, H = 6,72%, N = 8,61% (Calculado para  
 $C_{17}H_{35}N_5O_9 \cdot 5/2H_2SO_4 \cdot 5H_2O$ : C = 25,89%, H = 6,39%, N = 8,88%).

El espectro de absorción en el ultravioleta  
de una solución acuosa de sulfato de XK-88-3 (Fig. 5) no re-  
vela ningún máximo de absorción característico entre 220-  
360 m $\mu$ , sino solamente una absorción terminal. El espectro  
10 de absorción infrarroja del sulfato de XK-88-3 (como table-  
ta de KBr) se representa en la Fig. 6. Como se deduce de la  
figura, el XK-88-3 presenta picos en las siguientes longitu-  
des de onda expresadas en centímetros recíprocos (cm<sup>-1</sup>):

3400, 3000, 1615, 1505, 1125,  
15 1030, 620

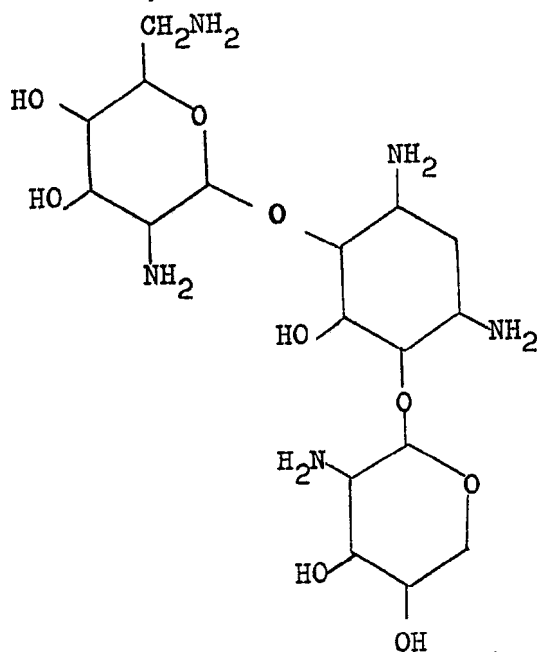
Además la confirmación de las características  
del XK-88-3 se deriva de la Fig. 11 que ilustra el espec-  
tro de RMN (protón) de la base libre del XK-88-3.

Con respecto a los ensayos de color, el sulfa-  
20 to de XK-88-3 da reacciones positivas en el ensayo de ninhi-  
drina y ensayo de Rydon-Smith y da reacciones negativas en  
el ensayo de Sakaguchi, ensayo de maltol, ensayo de cloruro  
férico, ensayo Fehling y ensayo de biuret.

El sulfato de XK-88-3 es muy soluble en agua,  
25 poco soluble en metanol y etanol e insoluble en disolventes  
orgánicos tales como acetona, acetato de etilo, eter etíli-  
co, cloroformo, etc.

Basado en lo anterior se cree que el XK-88-3  
tiene la siguiente estructura química:

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30



XK-88-5

El sulfato de XK-88-5 es un polvo blanco. El punto de fusión del sulfato es 215-240°C (descomposición). La rotación óptica del sulfato es  $[\alpha]_D^{28} = +93,9^\circ$  (C = 0,54, H<sub>2</sub>O). Como resultado de la medida de un espectro de masas de alta resolución, se determina que el XK-88-5 tiene un peso molecular de 450 y una fórmula molecular de C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>. El análisis elemental del XK-88-5 revela: C = 25,89%, H = 6,50%, N = 9,74% (Calculado para C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> · SH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O: C = 25,35%, H = 6,62%, N = 9,85%).

El espectro de absorción ultravioleta de una solución acuosa del sulfato de XK-88-5 (Fig. 7) no revela ningún máximo de absorción característico entre 220-360 mμ sino solamente muestra una absorción terminal. El espectro de absorción en el infrarrojo del sulfato de XK-88-5 (como tableta de KBr) se representa en la Fig. 8. Como se deduce de la figura, XK-88-5 muestra picos en las siguientes longitudes de onda expresadas en centímetros recíprocos (cm<sup>-1</sup>):

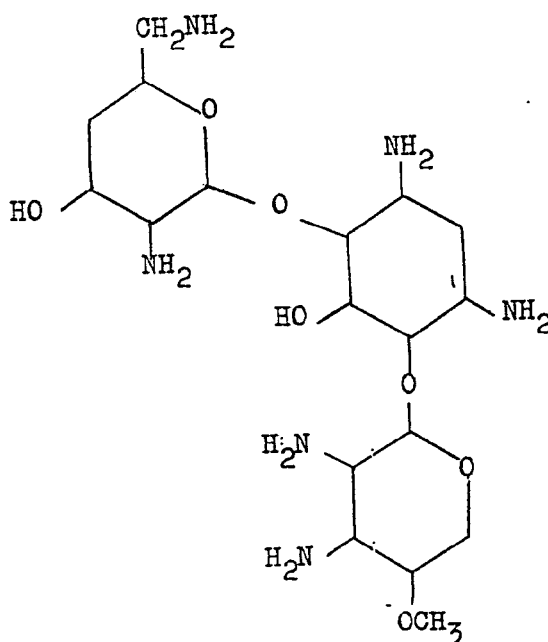
3400, 2900, 1600, 1500, 1390,  
1110, 1040, 610

Además la confirmación de las características de XK-88-5 se deriva de las Figs. 12 y 15 que representan el espectro de RMN (protón) de la base libre y del espectro de RMN - C<sup>13</sup> del sulfato, respectivamente.

Con respecto a los ensayos de color, el sulfato de XK-88-5 da reacciones positivas en el ensayo de ninhidrina y ensayo de Rydon-Smith y da reacciones negativas en el ensayo de Sakaguchi, ensayo de maltol, ensayo de cloruro férrico, ensayo de Fehling y ensayo de biuret.

El sulfato de XK-88-5 es muy soluble en agua, poco soluble en metanol y etanol e insoluble en disolventes orgánicos tales como acetona, acetato de etilo, eter etílico, cloroformo, etc.

Basado sobre lo anterior se cree que el XK-88-5 tiene la siguiente estructura química:





1

1: solución acuosa de cloruro amónico al 20%

2: n-butanol saturado con agua

5

3: n-butanol : ácido acético :  
agua (3:1:1)

4: n-butanol saturado con agua que  
contiene 2% en peso/volumen de  
ácido p-toluensulfónico y 2% en  
peso/volumen de piperidina

10

5: cloroformo : metanol : amoniaco  
acuoso al 17% (2:1:1 la capa in-  
ferior de la mezcla)

15

20

25

30

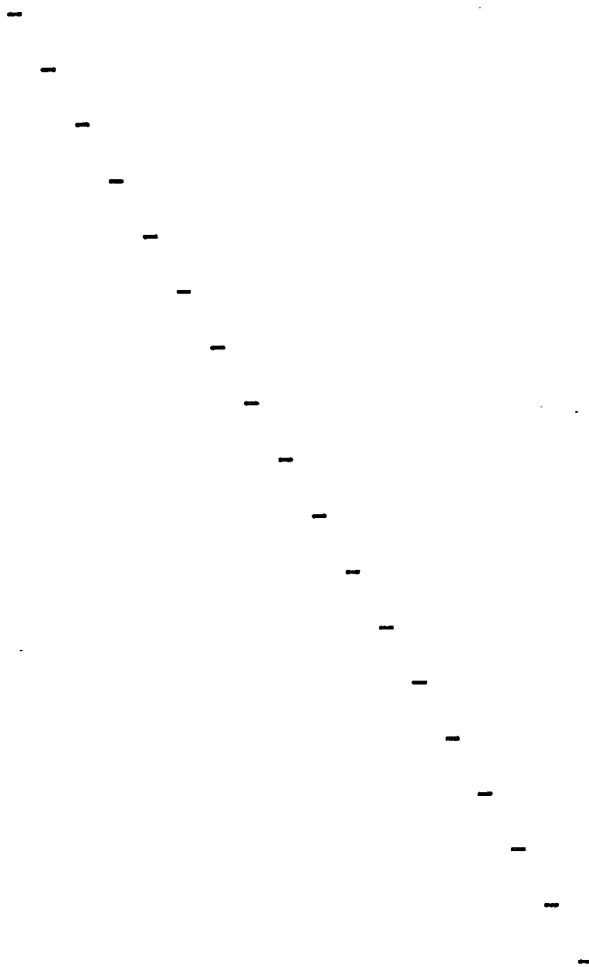


Tabla 3

1

5

10

15

20

25

30

		Valor del Rf							
		Cromatografía en capa fina de gel de sílice			Cromatografía sobre papel (método ascendente)				
		Revelador							
		I	II	M	1	2	3	4	5
	XK-88-1	0,80	0,58	0,31	0,97	0,00	0,10	0,00	0,00
	XK-88-2	0,73	0,45	0,38	0,98	0,00	0,08	0,00	0,00
	XK-88-3	0,75	0,39	0,27	0,97	0,00	0,00	0,00	0,00
	XK-88-5	0,81	0,20	0,50	0,75	0,00	0,05	0,00	0,01
	Gentamicina A	0,66	0,39	0,38	0,98	0,00	0,05	0,00	0,00
	Gentamicina B	0,75	0,38	0,28	0,98	0,00	0,08	0,00	0,00
	Gentamicina C <sub>1a</sub>	0,86	0,18	0,52	0,98	0,02	0,08	0,05	0,18
	Gentamicina C <sub>1</sub>	0,87	0,17	0,59	0,98	0,03	0,08	0,08	0,59
	Gentamicina C <sub>2</sub>	0,86	0,18	0,61	0,98	0,02	0,03	0,09	0,38
	Sisomicina	0,89	0,66	-	0,98	0,00	0,06	0,10	0,18
	Kanamicina A	0,77	0,76	0,15	0,92	0,00	0,00	0,00	0,02
	Kanamicina B	0,80	0,80	0,16	0,98	0,00	0,00	0,00	0,01
	Kanamicina C	0,84	0,84	0,17	0,96	0,00	0,00	0,00	0,02
	Ribostamicina	0,75	0,72	0,12	0,98	0,01	0,03	0,01	0,00
	Apramicina	0,80	0,35	0,15	0,95	0,00	0,00	0,00	0,02
	factor 4 Nebramicina	0,78	0,45	0,16	0,95	0,00	0,05	0,00	0,01
	Nebramicina factor 5	0,79	0,45	0,14	0,95	0,00	0,05	0,00	0,00
	Tobramicina	0,80	0,54	0,25	0,97	0,00	0,02	0,02	0,02
	Neomicina A	0,40	0,71	-	0,97	0,00	0,02	0,02	0,00
	NK-1003	0,66	0,91	-	0,93	0,00	0,05	0,00	-

1 Los espectros antibacterianos in vitro de los antibióticos XK-88 por el método de dilución con agar (pH 8,0) se representan en la siguiente Tabla 4:

Tabla 4

5 Concentración inhibidora mínima (µg/ml) por el método de dilución con agar (pH 8,0)

		M.I.C. (µg/ml)			
Microorganismo ensayado		XK-88-1	XK-88-2	XK-88-3	XK-88-5
10	<u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 10541	> 416,5	> 83,3	> 83,3	10,5
	<u>Bacillus subtilis</u> No. 10703	52,1	0,35	2,7	0,04
15	<u>Bacillus cereus</u> ATCC 9634	6,6	2,7	2,7	1,31
	<u>Bacillus cereus var. mycoides</u> ATCC 9463	3,3	0,7	2,7	0,66
20	<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	6,6	0,18	0,18	0,07
	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8942 (resistente a Kanamicina, Paromomicina, Estreptomycin, Gentamicina y Nebramicina)	52,1	1,4	1,4	0,66
25	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8950 (resistente a Estreptomycin, Tetraciclina, Penicilina y sulfonamida)	13,1	0,35	0,35	0,17
30					

Tabla 4  
(continuación)

1					
5	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8956 (resistente a Estreptomomicina, Paromomicina, Tetraciclina, Kanamicina, Nebramicina, Tobramicina y Eritromicina)	208,5	0,09	5,3	<0,02
10	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8957 (resistente a Cloramfenicol, Estreptomomicina, Kanamicina, Paromomicina, Nebramicina, Tobramicina y Tetraciclina)	104,2	0,09	5,3	0,04
15	<u>Staphylococcus aureus</u> KY 8953 (resistente a Estreptomomicina, Kanamicina, Paromomicina, Neomicina, Tetraciclina, Eritromicina)	>416,5	0,35	>83,3	0,17
	<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	13,1	0,18	0,05	<0,05
	<u>Escherichia coli</u> ATCC 26	26,1	0,35	0,18	0,08
20	<u>Escherichia coli</u> KY 8310 (resistente al Cloramfenicol, Estreptomomicina, Kanamicina, Gentamicina, Paromomicina, Nebramicina, Tobramicina, Espectomicina y Tetraciclina)	>416,5	>83,3	>83,3	>41,6
25	<u>Escherichia coli</u> KY 8314 (resistente a Estreptomomicina)	52,1	1,4	0,35	0,33
30					

Tabla 4  
(continuación)

1					
5	<u>Escherichia coli</u> KY 8327 (resistente a Kanamicina, Gentamicina, Nebramicina y Tobramicina)	13,1	0,18	0,05	0,04
10	<u>Escherichia coli</u> KY 8331 (resistente a Kanamicina, Ribostamicina, Neomicina, Paromomicina, Lividomicina y Nebramicina)	>416,5	41,7	41,7	20,8
15	<u>Escherichia coli</u> KY 8334 (resistente a Kanamicina y Tobramicina)	1,65	5,3	5,3	0,66
15	<u>Escherichia coli</u> KY 8348 (resistente a Estreptomina y Gentamicina)	13,5	0,18	0,09	2,7
	<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	416,5	1,4	1,4	0,53
20	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH # 1	>416,5	10,5	>416,5	8,3
20	<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	52,1	1,4	0,35	0,14
25	<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 9992	26,1	0,7	0,18	0,09
30	<p>Como se deduce de la anterior Tabla 4, todos los antibióticos de la serie XK-88 presentan una actividad antibacteriana muy fuerte frente a un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Particularmente XK-88-1, XK-88-2, XK-88-3 y XK-88-5 exhiben una fuerte ac-</p>				

1 actividad antibacteriana frente a Staphylococcus aureus y  
Escherichia coli que son normalmente resistentes a diversos  
antibióticos conocidos.

5 Una comparación de los antibióticos de la in-  
vención con otros diversos antibióticos ilustran sobre su  
novedad. Los antibióticos de la serie XK-88 son todos ellos  
solubles en agua, son antibióticos básicos y son compuestos  
dextrorrotatorios. Los espectros de absorción ultravioleta  
solo presentan absorción terminal y no revelan máximo de ab-  
10 sorción característico. El peso molecular de XK-88-1,  
XK-88-2, XK-88-3 y XK-88-5 (base libre) es 454, 306, 453 y  
450, respectivamente. De los anteriores, la Gentamicina A,  
Gentamicina B, Gentamicina C<sub>1a</sub>, Gentamicina C<sub>1</sub>, Gentamici-  
na C<sub>2</sub>, Kanamicina A, Kanamicina B, Kanamicina C, Ribostami-  
15 cina, Tobramicina, Apramicina, Nebramicina factor 4, Nebra-  
micina factor 5 y Sisomicina se consideran como antibióti-  
cos comparativamente similares a XK-88-1, XK-88-3 y XK-88-5.  
La Neomicina A y NK-1003 parece ser similar comparativamen-  
te a XK-88-2. Los valores R<sub>f</sub> de XK-88-3 en cromatografía en  
20 capa fina sobre gel de sílice y cromatografía de papel (Ta-  
bla 3) están muy cerca de los de Gentamicina B, pero los va-  
lores R<sub>f</sub> de otros miembros de la serie XK-88 son completa-  
mente diferentes de los de los antibióticos conocidos. El  
25 peso molecular de la base libre de XK-88-3 (453) es comple-  
tamente diferente del de la base libre de Gentamicina B  
(486). Se deduce también de la Tabla 4 que no siempre existe  
una resistencia cruzada por completo entre XK-88-1, XK-88-  
2, XK-88-3, XK-88-5 y los citados antibióticos conocidos.  
Por tanto, los XK-88-1, XK-88-2, XK-88-3 y XK-88-5 según  
30 lo anterior, hay que considerarlos a todos ellos como nue-

1 vos antibióticos.

Con los siguientes ejemplos específicos se ilustra la práctica de ciertos aspectos representativos de la invención.

5 Ejemplo 1

En este ejemplo, el Streptomyces hofuensis MK-88 (FERM-P Nº 2216) (ATCC 21970) se emplea como estirpe de siembra. Se inocula una asa de la estirpe de siembra en 30 ml de un primer medio de siembra que tiene la siguiente composición en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se cultiva a 30°C durante 3 días con sacudidas.

Almidón soluble	20 g/l
Polipeptona	5 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Carbonato cálcico	1 g/l

(pH: 7,0 antes de la esterilización)

Después se inoculan 30 ml del primer cultivo de siembra en 300 ml de un segundo medio de siembra en un matraz Erlenmeyer de 2 l provisto de deflectores. La composición del segundo medio de siembra es la misma que la del primer medio de siembra. El segundo cultivo de siembra se lleva a cabo a 30°C durante 2 días con agitación. Después de esto, se inocula 1,5 l del segundo cultivo de siembra (correspondiente al contenido de 5 matraces) en 15 l de un tercer medio de siembra en una vasija de fermentación de acero inoxidable de 30 l. De nuevo la composición del tercer medio de siembra es la misma que la del primer medio de siembra.

El cultivo en la vasija de fermentación se lleva a cabo a 30°C durante 2 días con aireación (15 l/min) y agitación (350 r.p.m). Se inoculan entonces 15 l del ter-

1 cer cultivo de siembra en 100 litros de un cuarto medio de  
siembra en un fermentador de 300 l. La composición del cuar  
to medio de siembra es la misma que la del primer medio de  
siembra. El cultivo en el fermentador se lleva a cabo a  
5 30°C durante 2 días con aireación (100 l/min) y agitación  
(150 r.p.m.). Finalmente se inoculan 100 l del cuarto cul  
tivo de siembra en 1000 l de un medio de fermentación en un  
fermentador de 2000 l. La composición del medio de fermen  
tación es como sigue:

10	Almidón soluble	40 g/l
	Harina de soja	20 g/l
	Extracto de carne	5 g/l
	$K_2HPO_4$	0,5 g/l
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g/l
15	KCl	0,3 g/l
	$CaCO_3$	3 g/l
	(pH: 7,0 antes de esterilización)	

El cultivo se lleva a cabo a 30°C durante 4 días con airea  
ción (400 l/min) y agitación (150 r.p.m.).

20 Después de haberse completado el cultivo se  
acumula una mezcla de XK-88-1, XK-88-2, XK-88-3 y XK-88-5  
en el líquido de cultivo. El rendimiento total calculado  
como actividad antibacteriana es 3,5 mg/l basado sobre el  
sulfato de XK-88-5.

### 25 Ejemplo 2

En este ejemplo, se ajustan 1.000 l del líqui  
do de cultivo obtenido en el Ejemplo 1 a pH 7,5 con ácido  
sulfúrico concentrado.

30 Se añaden a ello aproximadamente 10 kg de un  
auxiliar de filtración, Radiolite # 600 (nombre comercial producido

1 por Showa Kagaku Kogyo Co., Ltd., Japón) y se separan las  
células microbianas y la materia insoluble por filtración.  
Se pasa el filtrado a través de una columna rellena con 100  
5 l aproximadamente de una resina de intercambio catiónico,  
Amberlite IRC-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Las sustancias activas son ab-  
sorbidas sobre la resina. Después de lavar con 300 l de  
agua aproximadamente, se lleva a cabo la elución con amonia-  
co acuoso 0,5 N. Se determina la actividad del eluato por  
10 el método de disco de papel sobre placa de agar utilizando  
Bacillus subtilis Nº 10707. Las fracciones activas se combi-  
nan y concentran a 6 l a presión reducida. Se ajusta el con-  
centrado a pH 7,5 con ácido sulfúrico concentrado y se sepa-  
ra el precipitado por filtración. Se pasa el filtrado a tra-  
15 vés de una columna rellena con 2 l de Amberlite IRC-50 (for-  
ma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavar con 10 l de agua, se lleva a ca-  
bo la elución con amoniaco acuoso 0,5N y las fracciones ac-  
tivas se combinan y concentran a aproximadamente 300 ml a  
presión reducida, ya que el concentrado contiene impurezas  
de color pardo, se ajusta a pH 7,5 con ácido sulfúrico con-  
20 centrado y se pasa a través de una columna rellena con 500  
ml aproximadamente de carbón activo granular para eliminar  
las impurezas. La elución se lleva a cabo con 1 l de agua  
aproximadamente y después con aproximadamente 2 l de ácido  
25 sulfúrico 0,5N, con lo que la mayor parte de las sustancias  
activas se eluyen en forma más pura. Las fracciones activas  
activas se eluyen en forma bastante pura. Las fracciones actias  
zan con una resina de intercambio aniónico Dowex 44 (forma  
 $\text{OH}^-$ ) y se mezclan con las fracciones activas obtenidas por  
30 elución con agua. La mezcla se concentra entonces a presión  
reducida, con lo que se obtiene un polvo bruto que contiene

1 la serie XK-88. La actividad total del polvo así obtenido  
corresponde a la de aproximadamente 3 g de sulfato de  
XK-88-5.

Ejemplo 3

5 En este ejemplo, el polvo bruto que contiene  
XK-88-1, XK-88-2, XK-88-3 y XK-88-5 obtenido en el Ejemplo  
2 se disuelve en 3 l de agua aproximadamente y se ajusta a  
pH 8,0 con ácido sulfúrico concentrado. Se pasa entonces  
10 la solución a través de una columna rellena con aproxima-  
mente 500 ml de una resina de intercambio catiónico, Amber-  
lite CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavar la columna con  
agua, se lleva a cabo la elución con 4,5 l de amoníaco 0,2N  
y después con amoníaco 0,5N, a una velocidad de aproxima-  
mente 1 litro/hora. Se recoge el eluato en fracciones de 20  
15 ml cada una. Empleando amoníaco acuoso 0,2 N, se eluyen  
XK-88-1 y una mezcla de XK-88-3 y XK-88-5 en las fracciones  
Núms. 50-165 y en las fracciones Núms. 166-230, respectiva-  
mente. Después de esto se eluye el XK-88-2 empleando amo-  
niaco acuoso 0,5N.

20 Se confirman los componentes activos conteni-  
dos en cada fracción por cromatografía en capa fina sobre  
gel de sílice. El revelado se lleva a cabo a la temperatura  
ambiente durante 3-4 horas utilizando revelador II (aceta-  
to amónico al 10%: metanol : 1:1) y revelador M (n-butanol:  
25 etanol : cloroformo : amoníaco acuoso al 17% = 4:5:2:5).  
Los componentes se detectan por reacciones coloreadas tales  
como reacción de ninhidrina y reacción de Rydon-Smith. La  
actividad de los componentes se determina por bioautogra-  
30 fía utilizando una placa de agar de Bacillus subtilis N<sup>o</sup>  
10707. Con revelador II, los XK-88-1, XK-88-2, XK-88-3 y

1 XK-88-5 muestran valores Rf de 0,58, 0,45, 0,39 y 0,20 res-  
pectivamente y con revelador M, los XK-88-1, XK-88-2,  
XK-88-3 y XK-88-5 muestran valores Rf de 0,31; 0,38, 0,27 y  
0,50 respectivamente.

5 Se concentran entonces, respectivamente, las  
fracciones activas a presión reducida para separar amonia-  
co. Como resultado se obtiene un concentrado que contiene  
XK-88-1, un concentrado que contiene XK-88-2 y un concentra-  
do que contiene XK-88-3 y XK-88-5. El rendimiento de las  
10 sustancias activas contenidas en cada concentrado correspon-  
de a aproximadamente 250 mg, 200 mg y 1,5 g de sulfato de  
XK-88-5, respectivamente.

#### Ejemplo 4

15 En este ejemplo, se concentra la fracción ac-  
tiva que contiene XK-88-1 como componente principal, que  
se obtiene en el Ejemplo 3. Se disuelve el concentrado en  
50 ml aproximadamente de metanol a 5% y la solución se ha-  
ce pasar a través de una columna rellena con aproximadamen-  
te 200 ml de gel de sílice tratado previamente con metanol  
20 al 50%. El XK-88-1 se eluye primero con metanol al 50%. Des-  
pués de esto se eluyen trazas de contaminación de XK-88-3  
y XK-88-5 con metanol al 50% que contiene acetato amónico  
al 5%. Después de confirmar por cromatografía en capa fina  
de gel de sílice utilizando revelador II y revelador M que  
25 la fracción primero obtenida contiene un componente único,  
XK-88-1, se concentra la fracción a presión reducida para  
separar el metanol. Se ajusta el concentrado a pH 7,5 con  
ácido sulfúrico 6N y se hace pasar a través de una columna  
(aproximadamente 200 ml) rellena con Amberlite CG-50 (for-  
30 ma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavar la columna con agua, se lleva a

1       cabo la elución con 1 l de amoniaco acuoso 0,2N. Para sepa-  
2       rar el amoniaco se concentra la fracción activa a 50 ml apro-  
3       ximadamente a presión reducida. Además, se ajusta el concen-  
4       trado a pH 4,5 con ácido sulfúrico 6N y se añaden unos 200  
5       volúmenes de metanol gota a gota, agitando al mismo tiempo,  
6       con lo que se forma un precipitado blanco. Se separa el pre-  
7       cipitado por filtración y se lava con metanol. Después de  
8       secado, se obtiene aproximadamente 12 g de un preparado pu-  
9       rificado de sulfato de XK-88-1.

10       Ejemplo 5

11               En este ejemplo, se concentra la fracción ac-  
12       tiva que contiene XK-88-1 como componente principal, que se  
13       obtiene en el Ejemplo 3, a 50 ml aproximadamente bajo pre-  
14       sión. Se le añaden después 250 ml de metanol y se agita la  
15       mezcla durante 15 minutos. Después de dejar reposar la mez-  
16       cla a 0°C durante la noche, se forma un precipitado. El pre-  
17       cipitado se separa con filtro de vidrio. Ya que el preci-  
18       pitado es muy poco soluble en metanol, se lava con metanol.  
19       Después de lavado, se suspende el precipitado en 500 ml  
20       aproximadamente de metanol y se disuelve calentándolo. Se  
21       filtra entonces la solución y el filtrado se concentra a  
22       presión reducida. Como resultado, se forma un precipitado  
23       cristalino. Después de dejar reposar el concentrado a 0°C,  
24       se forma un precipitado adicional cristalino. El precipita-  
25       do se separa por filtración. La cristalización se lleva a  
26       cabo repetidamente de metanol. Los cristales incoloros así  
27       obtenidos se separan por filtración, y se lavan con metanol.  
28       Después de secar los cristales resultantes a presión reduci-  
29       da se obtienen 7 g de XK-88-1 (base libre).

30

1 Ejemplo 6

En este ejemplo se concentra la fracción activa que contiene XK-88-2 como componente principal, que se obtiene en el Ejemplo 3, a presión reducida y se le añade una cantidad igual de metanol. Se pasa la mezcla a través de una columna rellena con unos 200 ml de gel de sílice previamente tratados con metanol al 50%. Después de lavar la columna con 1 l de metanol al 50% aproximadamente, se lleva a cabo el revelado con metanol al 50% que contiene 5% de acetato de amonio. Primero se eluye XK-88-2 que presenta valores  $R_f$  de 0,45 y 0,38 en cromatografía en capa fina de gel de sílice empleando revelador II y revelador M, respectivamente. Después se eluyen trazas contaminantes de XK-88-3 y XK-88-5. Se confirma por cromatografía en capa fina de gel de sílice que la primera fracción obtenida contiene XK-88-2. La fracción activa que contiene XK-88-2 se concentra para eliminar el metanol. El concentrado se pasa entonces a través de una columna con relleno de 100 ml de Amberlite CG-50 (forma  $NH_4^+$ ) para desalar. Después de lavar la columna con agua, se lleva a cabo la elución con amoníaco acuoso 0,5N. La fracción activa se concentra y pasa a través de una columna rellena con 300 ml aproximadamente de gel de sílice. El revelado se lleva a cabo con un disolvente que comprende n-butanol, etanol, cloroformo y amoníaco acuoso al 17% (4:5:2:5). La fracción activa eluida se concentra para eliminar los disolventes orgánicos y el amoníaco. El concentrado se hace pasar entonces a través de una columna rellena con 100 ml aproximadamente de Amberlite CG-50 (forma  $NH_4^+$ ). Después de lavar la columna con agua, se lleva a cabo la elución con amoníaco acuoso 0,5N. La frac-

1 ción activa se concentra a 3 ml aproximadamente a presión  
reducida para eliminar el amoníaco. Se disuelve entonces  
el concentrado en 100 ml de metanol aproximadamente y se  
ajusta la solución a pH 4,5 con ácido sulfúrico 6N. Como re  
5 sultado se forma un precipitado blanco que se separa por  
filtración y se lava con metanol. Después de secar el pre-  
cipitado a presión reducida, se obtiene aproximadamente 250  
mg de un preparado purificado de sulfato de XK-88-2.

Ejemplo 7

10 En este ejemplo, se concentra la mezcla que  
contiene XK-88-3 y XK-88-5, obtenida en el Ejemplo 3, a 10  
ml aproximadamente. Se hace pasar el concentrado a través  
de una columna rellena con 500 ml aproximadamente de gel de  
sílice. El revelado se lleva a cabo con un disolvente que  
15 comprende n-butanol, etanol, cloroformo y amoníaco acuoso  
al 17% (4:5:2:5). El eluato se recoge en fracciones de 20  
ml cada una. Se eluyen XK-88-5 y XK-88-3 en las fracciones  
Núms. 95-121 y en las fracciones Núms. 133-158, respectiva-  
mente. El XK-88-3 contenido en las últimas fracciones pre-  
20 senta valores de Rf de 0,39 y 0,27 por cromatografía en ca-  
pa fina de gel de sílice utilizando revelador II y revela-  
dor M, respectivamente. El XK-88-5 contenido en las prime-  
ras fracciones exhibe valores Rf de 0,25 y 0,50 en cromato-  
grafía en capa fina de gel de sílice utilizando revelador  
25 II y revelador M, respectivamente. Después de confirmar el  
componente activo contenido en cada fracción según los an-  
teriores valores de Rf se combinan las fracciones que con-  
tienen los mismos componentes.

Ejemplo 8

30 En este ejemplo se seca la fracción activa

1 que contiene XK-88-3 como componente principal, obtenida  
en el Ejemplo 7, a presión reducida para eliminar los disol-  
2 ventos orgánicos y el amoniaco. El material seco resultante  
se disuelve en metanol al 50% y se pasa a través de una co-  
5 lumna rellena con 50 ml de gel de sílice. La columna se la-  
va entonces con metanol al 50% para eliminar cualquier tra-  
za de contaminación con XK-88-1. Después se eluye el XK-88-  
3 con metano al 50% que contiene 5% de acetato amónico. Se  
combinan las fracciones activas y se concentran a presión  
10 reducida para separar el metanol. El concentrado se pasa  
entonces a través de una columna rellena con 50 ml aproxima-  
damente de Amberlite CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ) y, después de lavar  
la columna con agua para eliminar el acetato de amonio, se  
lleva a cabo la elución con amoniaco acuoso 0,5N para obte-  
15 ner fracciones activas. Se combinan las fracciones activas y  
se concentran a 3 ml aproximadamente para eliminar el amo-  
niaco. Se ajusta el concentrado a pH de 4,5 con ácido sul-  
fúrico 6N y se añade gota a gota a 100 ml de etanol aproxi-  
madamente con lo que se forma un precipitado blanco. Se se-  
20 para entonces el precipitado por filtración, se lava con  
etanol y se seca a presión reducida, con lo que se obtiene  
60 mg aproximadamente de un preparado purificado de sulfato  
de XK-88-3.

#### Ejemplo 9

25 En este ejemplo, se concentra la fracción ac-  
tiva que contiene XK-88-5 como componente principal, obte-  
nida en el Ejemplo 7, bajo presión reducida. El concentrado  
se disuelve en una cantidad en exceso de metanol y se ajus-  
ta a pH de 4,5 con ácido sulfúrico 6N, con lo que precipi-  
30 ta un polvo bruto de sulfato de XK-88-5. El precipitado se

1 separa por filtración, se lava con metanol y se seca a presión reducida, con lo que se obtiene aproximadamente 600 mg de un polvo bruto de sulfato de XK-88-5. El polvo bruto así  
5 obtenido se suspende en un disolvente que comprende n-butanol, etanol, cloroformo y amoniaco acuoso concentrado (4:5:2:4). Se hace pasar la suspensión a través de una columna rellena de 500 ml aproximadamente de gel de sílice y el revelado se lleva a cabo con el mismo disolvente. Los  
10 componentes activos contenidos en las fracciones eluidas se examinan con referencia a los valores de Rf por cromatografía en capa delgada de gel de sílice. Las fracciones que contienen solamente XK-88-5 se combinan y concentran a presión reducida para eliminar disolventes orgánicos y amoniaco. Después de esto, se hace pasar el concentrado a través  
15 de una columna rellena con 200 ml de Amberlite CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavar la columna con agua, se lleva a cabo la elución con amoniaco acuoso 0,5N. La fracción activa se concentra a 10 ml aproximadamente a presión reducida para eliminar el amoniaco. Se disuelve entonces el concentrado en 200 ml aproximadamente de metanol y se ajusta  
20 a pH de 4,5 con ácido sulfúrico 6N, con lo que se forma un precipitado blanco. El precipitado se separa por filtración y se lava con metanol. La solución de metanol que contiene el precipitado se seca a presión reducida con lo que  
25 se obtienen 400 mg de un preparado purificado de sulfato de XK-88-5.

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

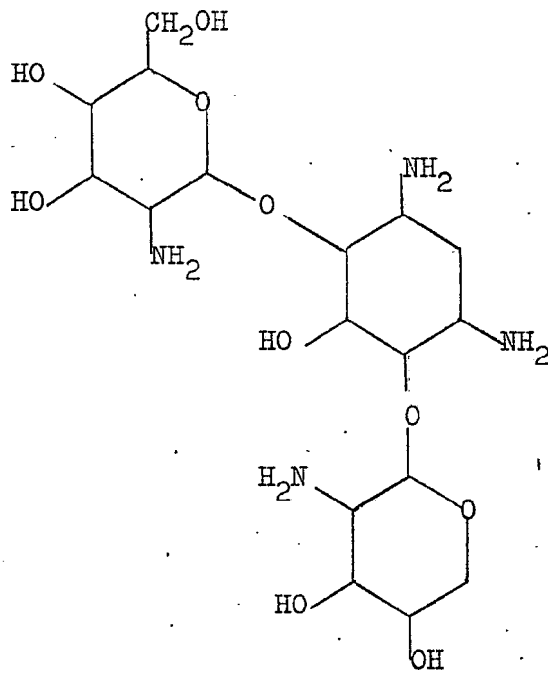
REIVINDICACIONES

30 1. Un método para producir compuestos antibioticos

1 de XK-88-1 de fórmula:

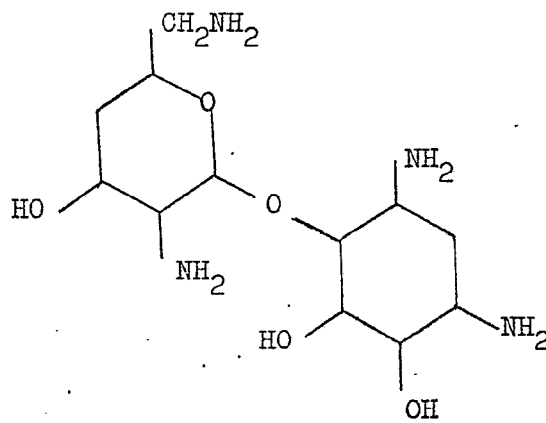
5

10



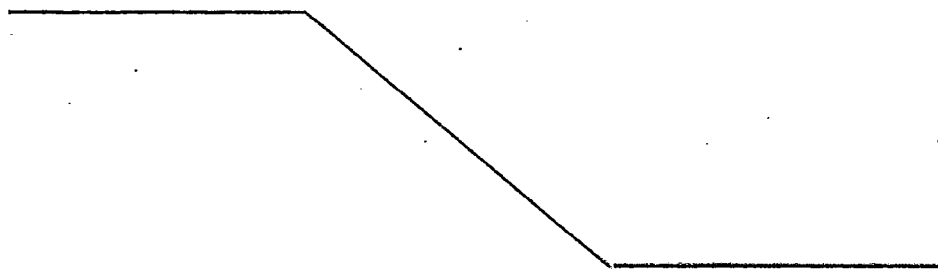
15 XK-88-2 de fórmula:

20

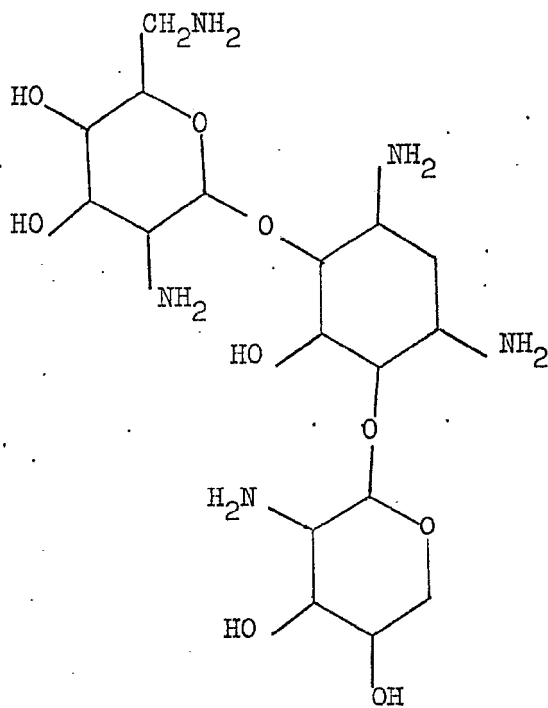


25

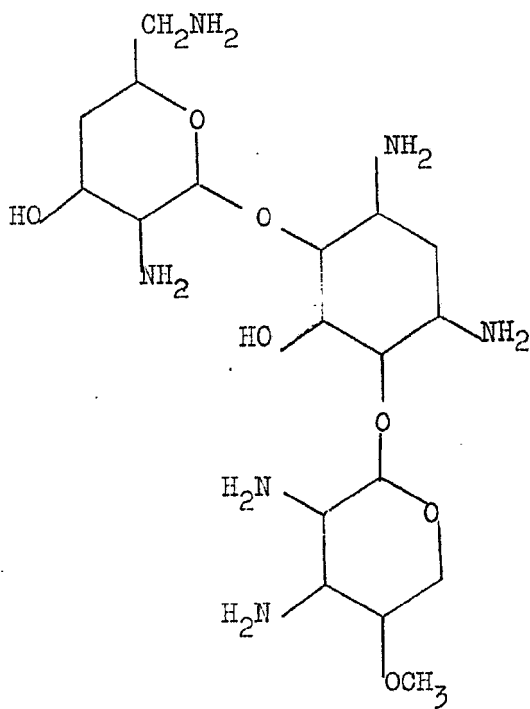
30



XK-88-3 de fórmula:



y XK-88-5 de fórmula:



1 cuyo procedimiento se caracteriza porque comprende cultivar  
un microorganismo que pertenece a las especies Streptomyces  
hofuensis, capaz de producir dichos antibioticos con un me-  
5 dio nutriente que contiene fuentes asimilables de nitrógeno  
y carbono bajo condiciones aerobias a una temperatura de en-  
tre 26º C a 43º C y a pH aproximadamente neutro hasta que se  
detecte una actividad antibacteriana sustancial en el licor  
de cultivo y aislar dichos antibioticos por métodos conoci-  
dos, y opcionalmente obtener los antibióticos como sulfatos  
10 por medios conocidos.

2. Un procedimiento, según la reivindicación 1,  
donde el citado microorganismo es Streptomyces hofuensis  
ATCC 21970.

3. Un procedimiento, según la reivindicación 1,  
15 donde dicha etapa de cultivo se prolonga de 2 a 15 días.

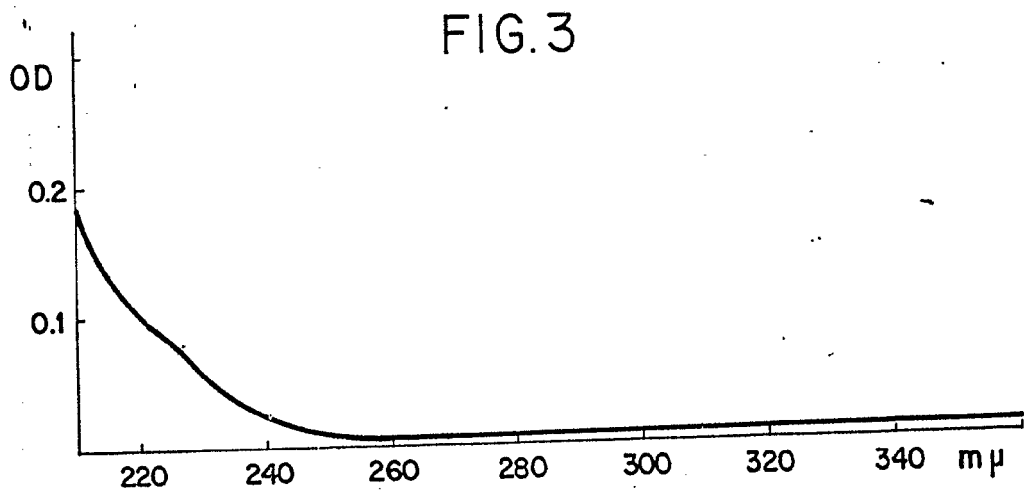
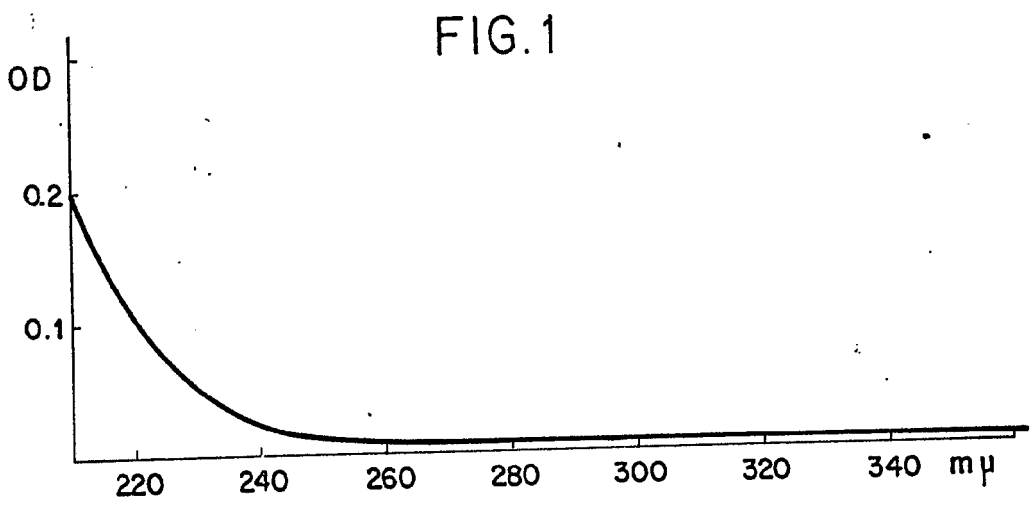
4. Se reivindica por último como objeto sobre el  
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
UN METODO PARA PRODUCIR COMPUESTOS ANTIBIOTICOS.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la  
presente Memoria descriptiva que consta de cuarenta y dos  
páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

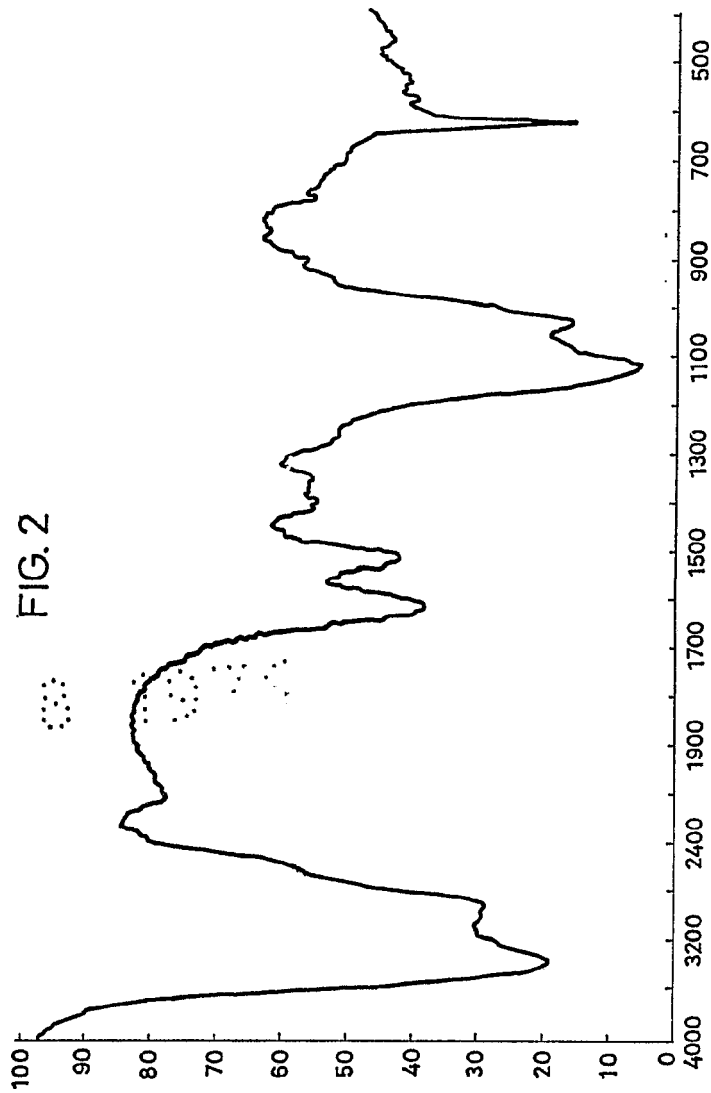
Madrid, 24 de Octubre de 1974  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.

25

30



**ESCALA VARIABLE**  
Madrid, 24 de Octubre de 1974  
**BERNARDO UNGRIA**  
P. P.



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Octubre de 1.974  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.

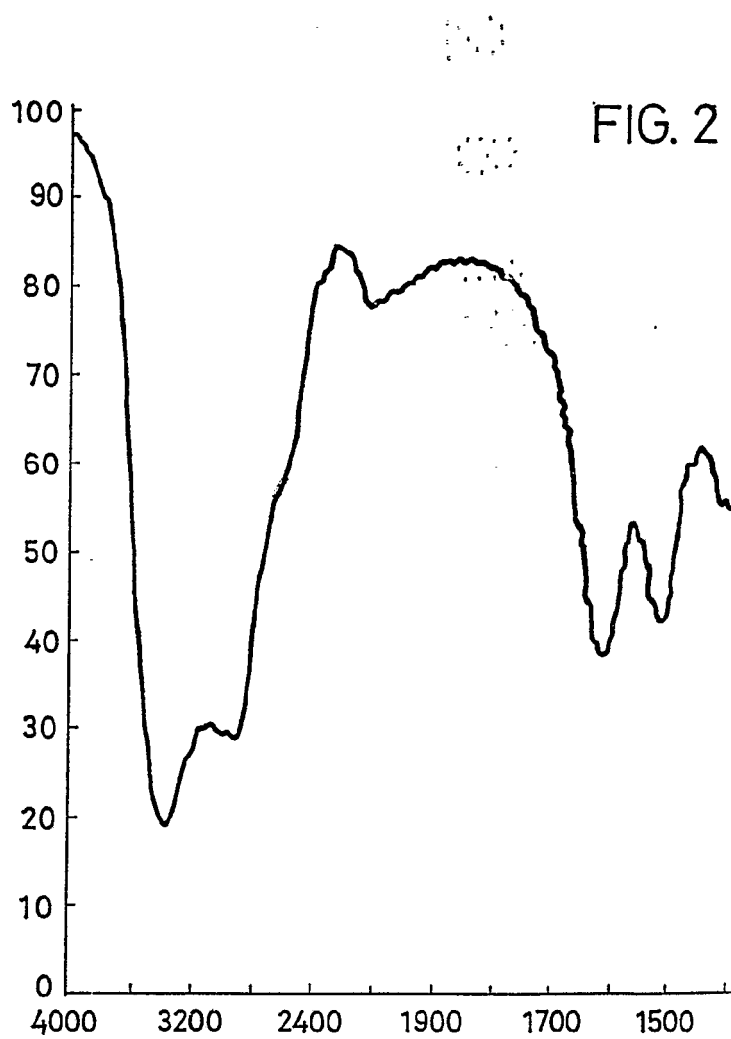
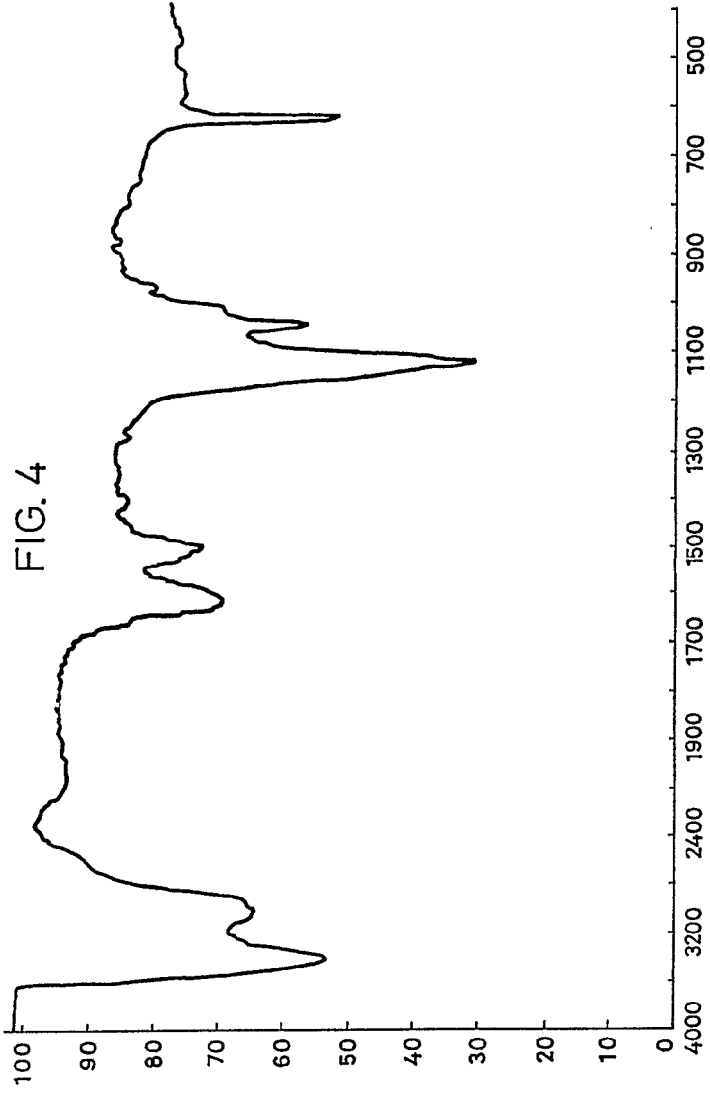


FIG. 2



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Octubre de 1.974  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Octubre de 1.974  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.

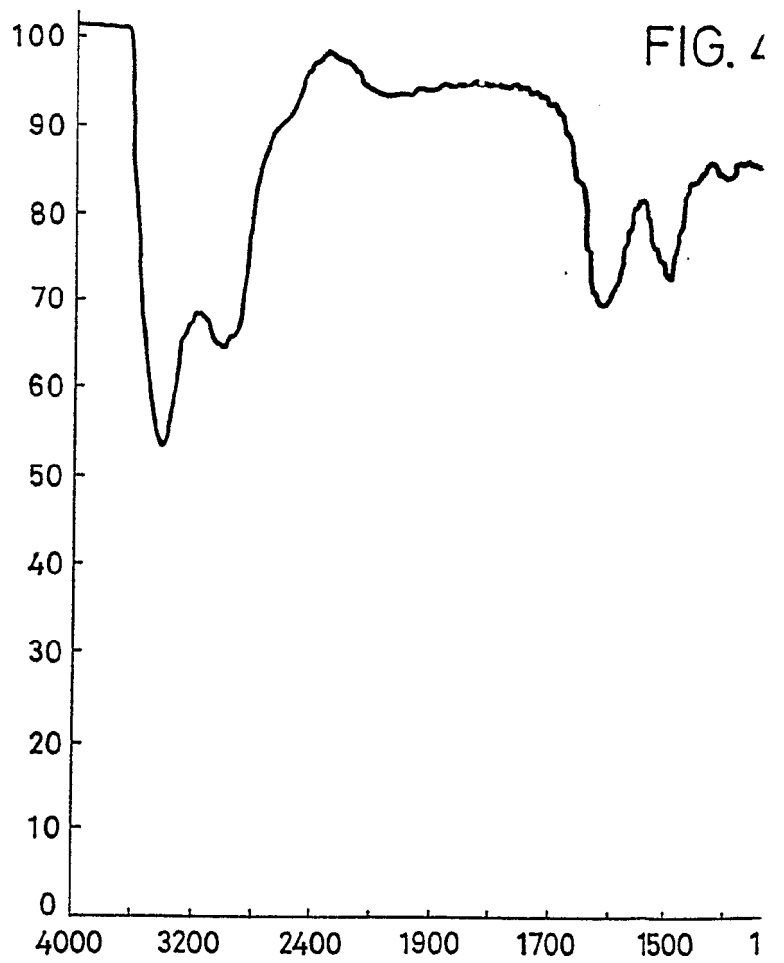
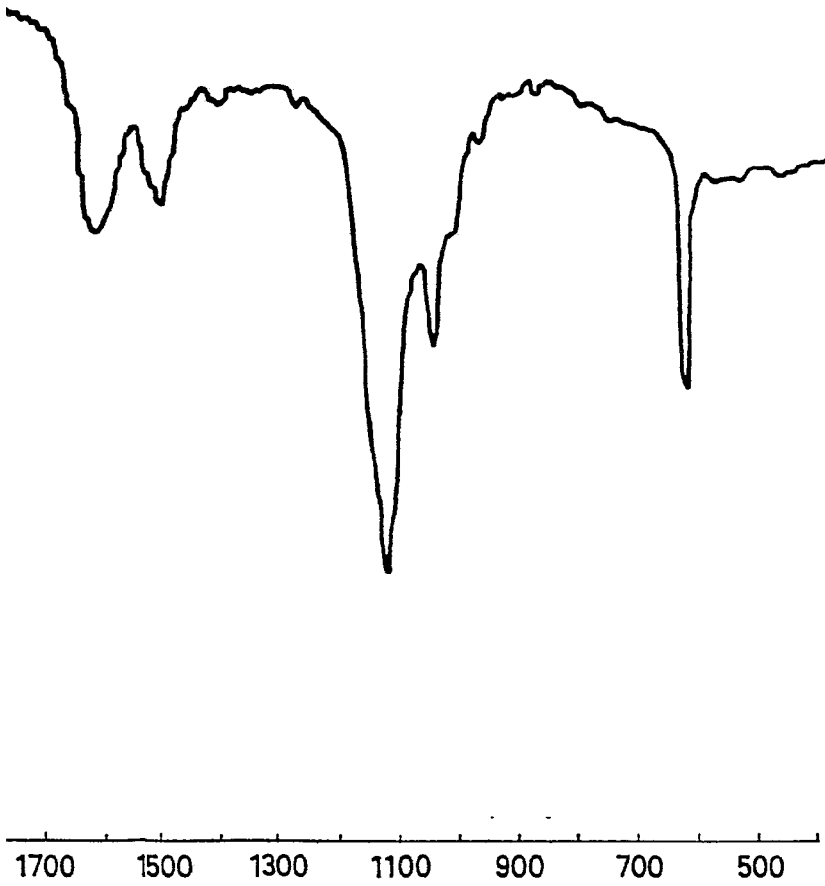


FIG. 4



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Octubre de 1.974  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.

FIG. 5

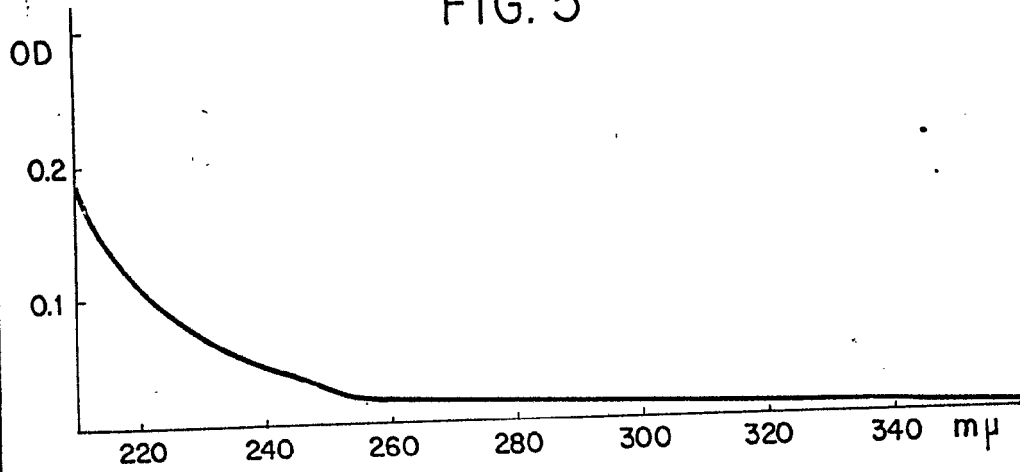
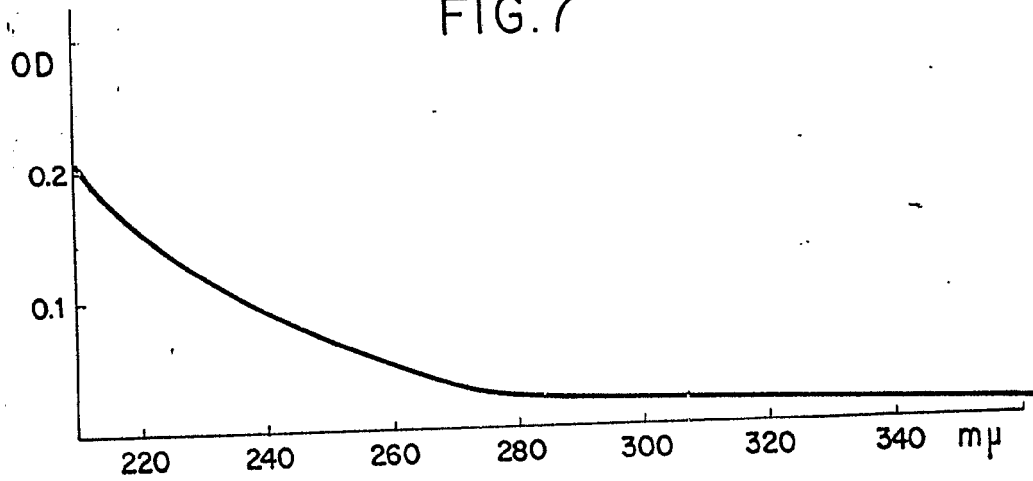


FIG. 7

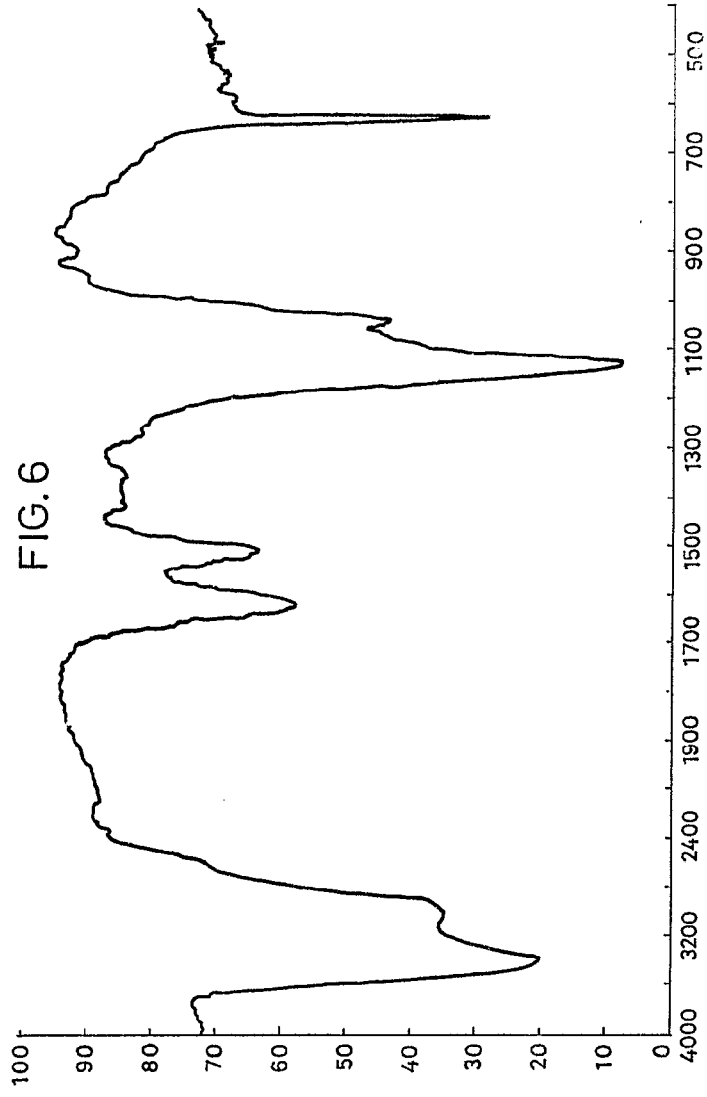


ESCALA VARIABLE

Madrid, 24 de 1 Octubre de 1974

BERNARDO UNGRIA

P. P.



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 Octubre de 1.974  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.

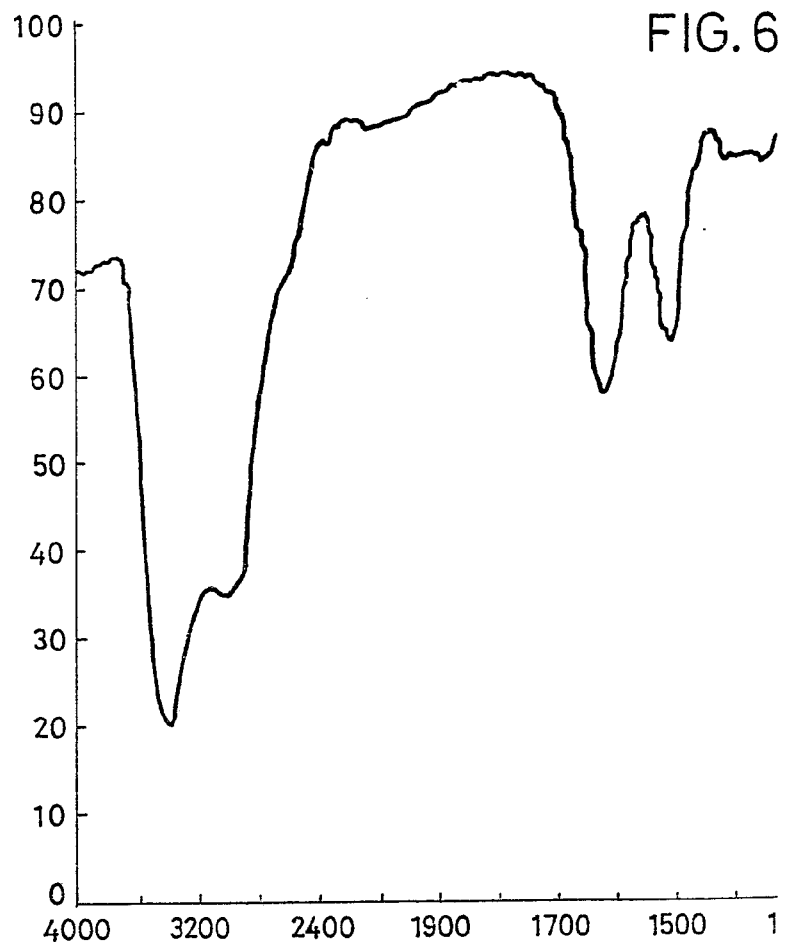
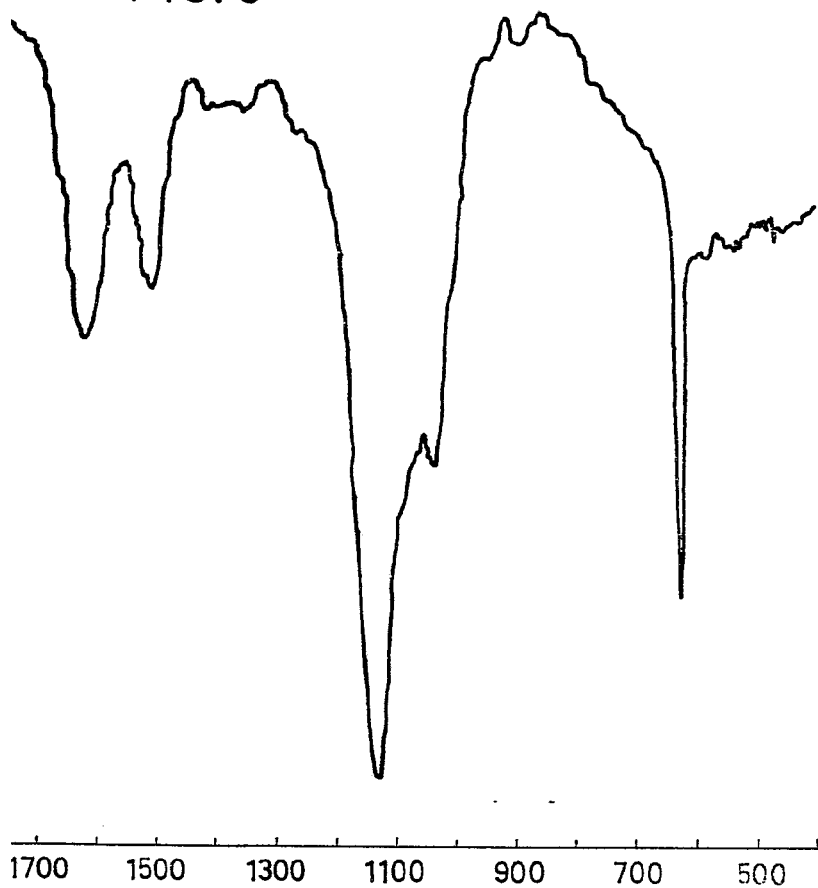
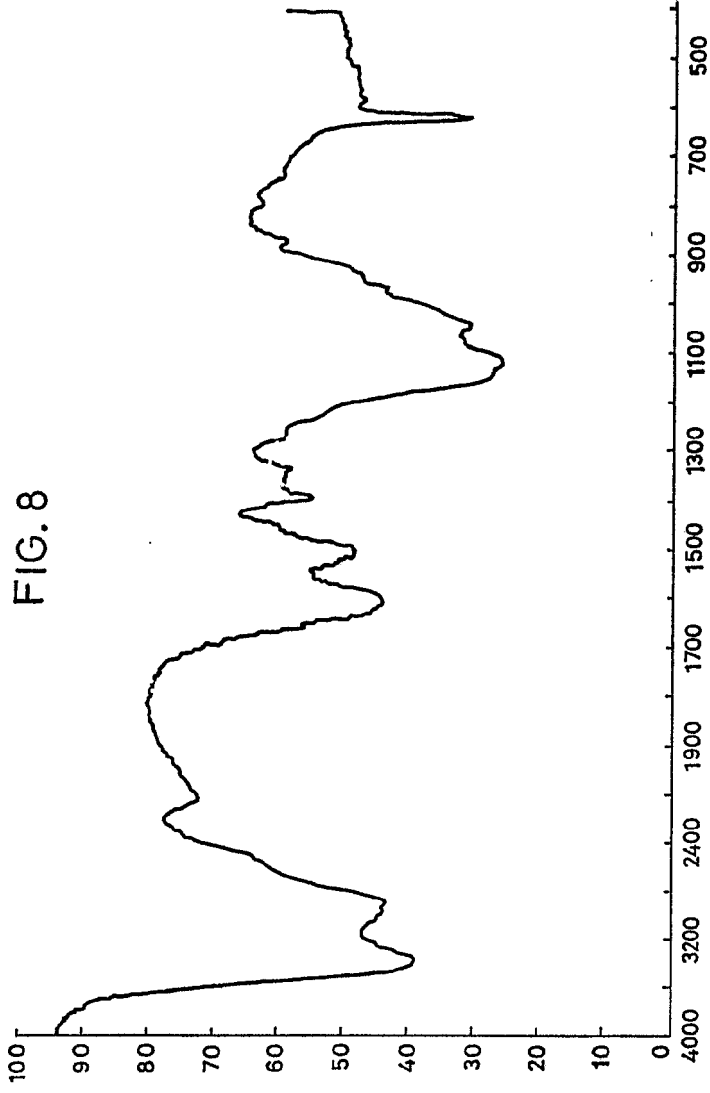


FIG.6



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 Octubre de 1.974  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Octubre 1.974  
BERNARDO JUNGRIA  
P.P.

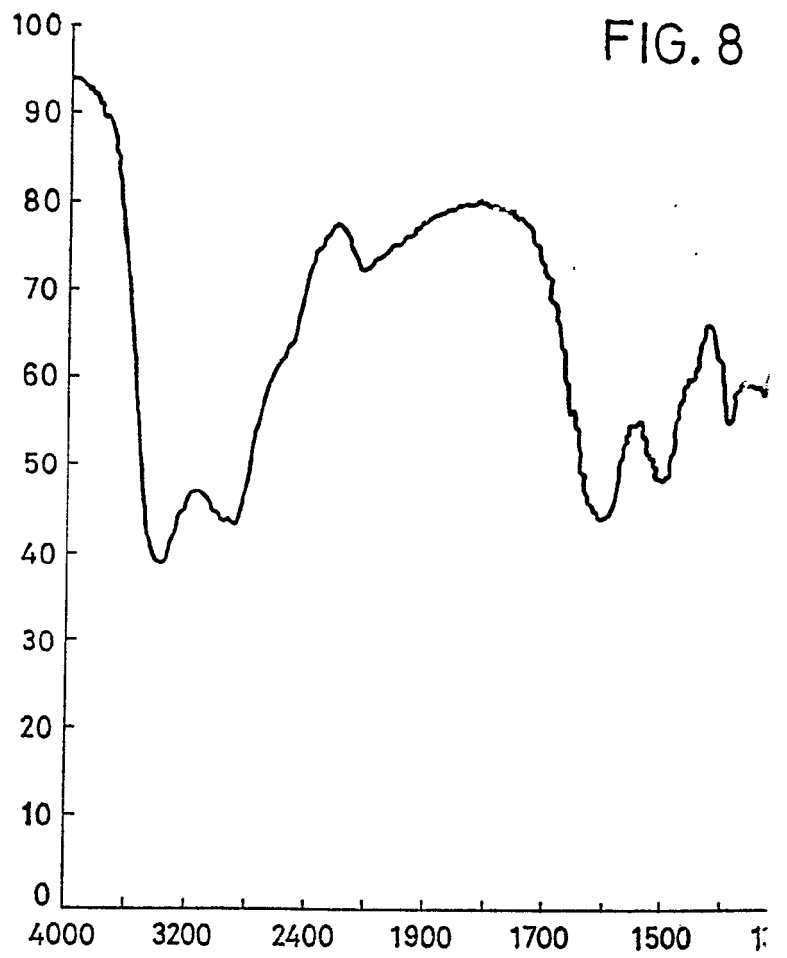
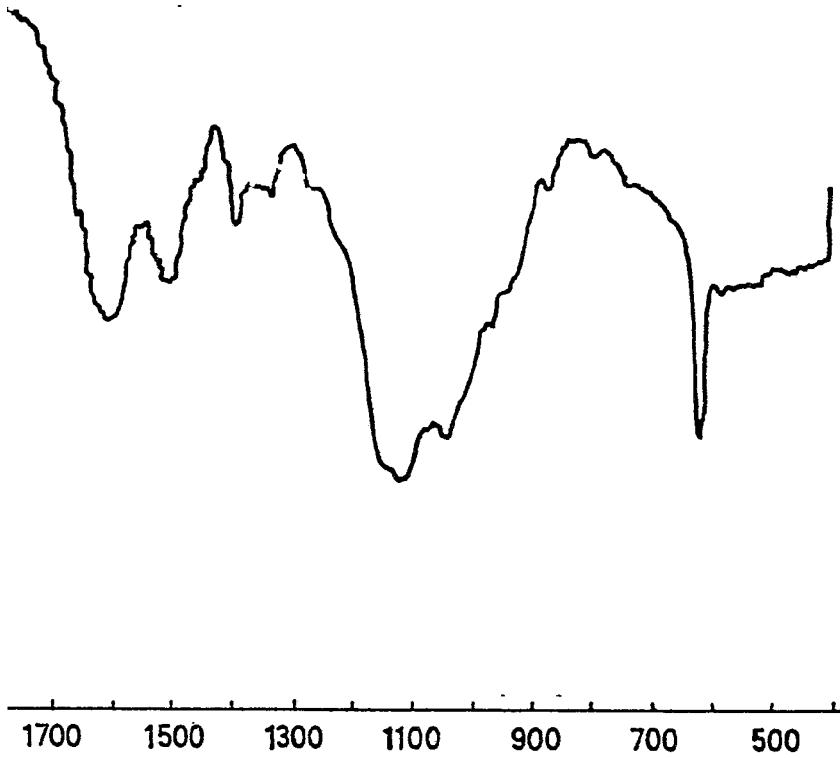


FIG. 8



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Octubre 1.974  
BERNARDO JINGRIA  
p.p.

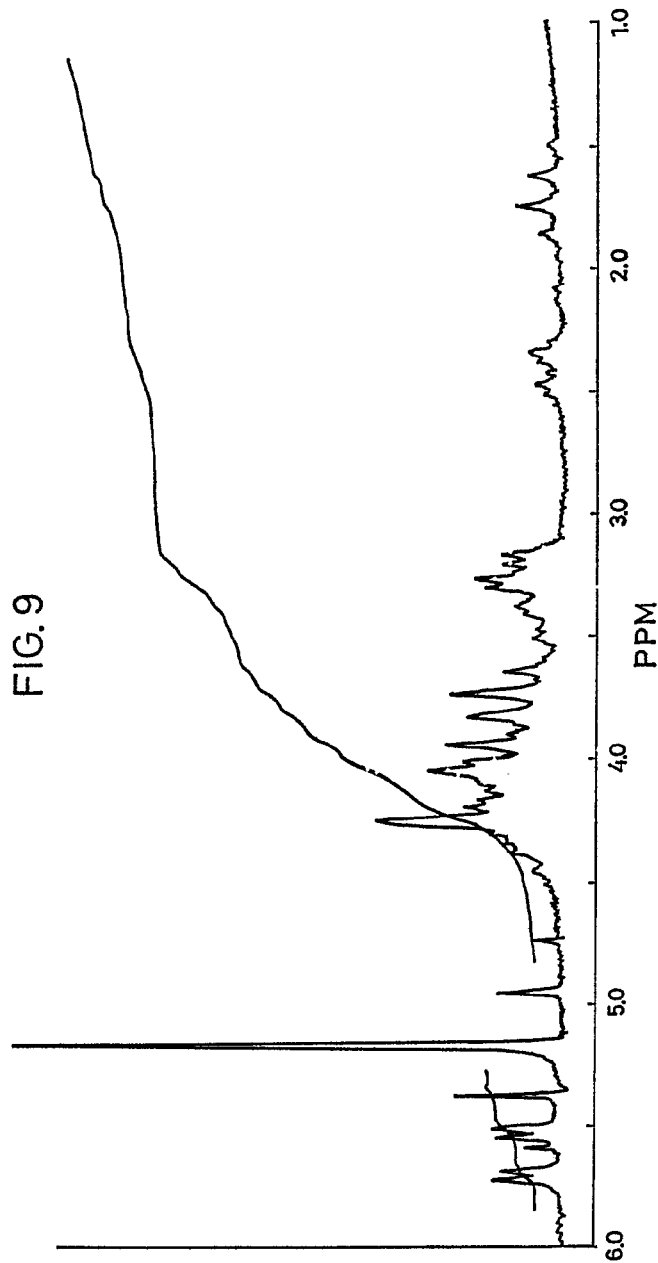
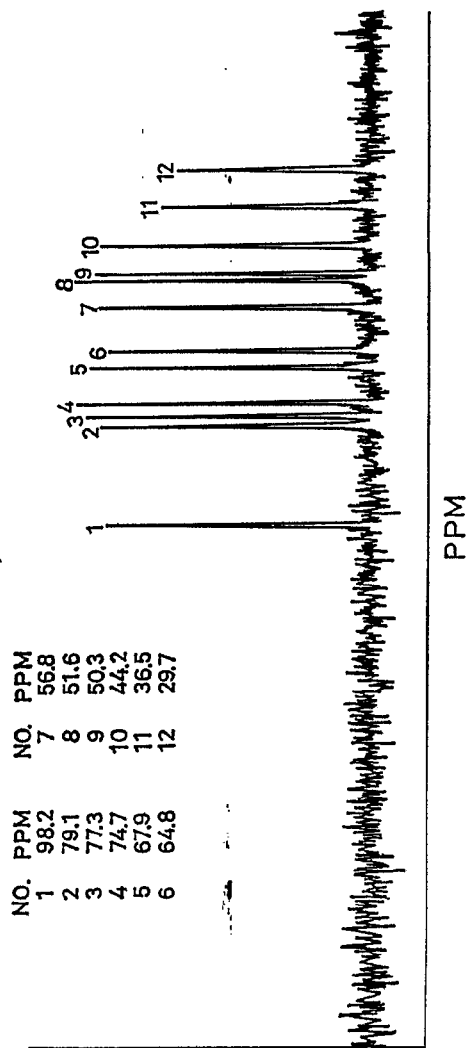


FIG. 14



ESCALA VARIABLE  
 Madrid, 24 de Octubre de 1.974  
 BERNARDO UNGRIA  
 P.P.

FIG. 9

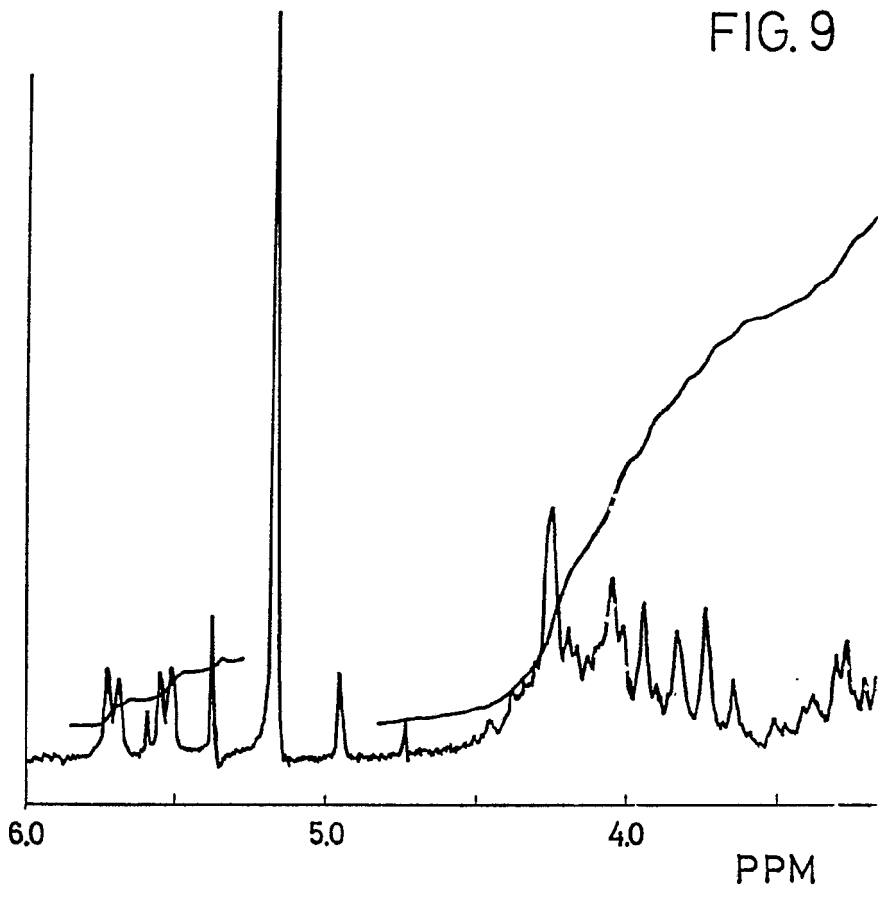


FIG. 14

NO.	PPM	NO.	PPM
1	98.2	7	56.8
2	79.1	8	51.6
3	77.3	9	50.3
4	74.7	10	44.2
5	67.9	11	36.5
6	64.8	12	29.7

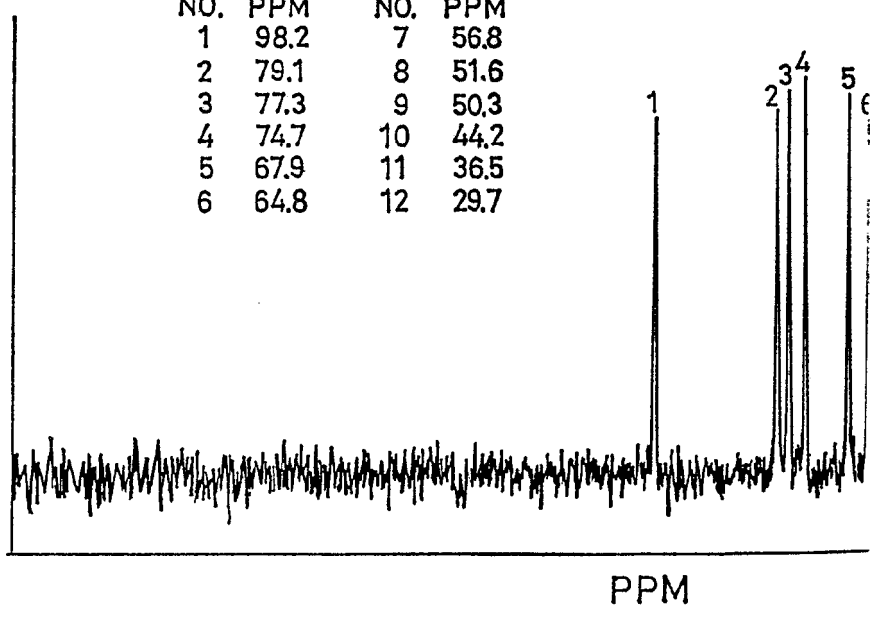


FIG. 9

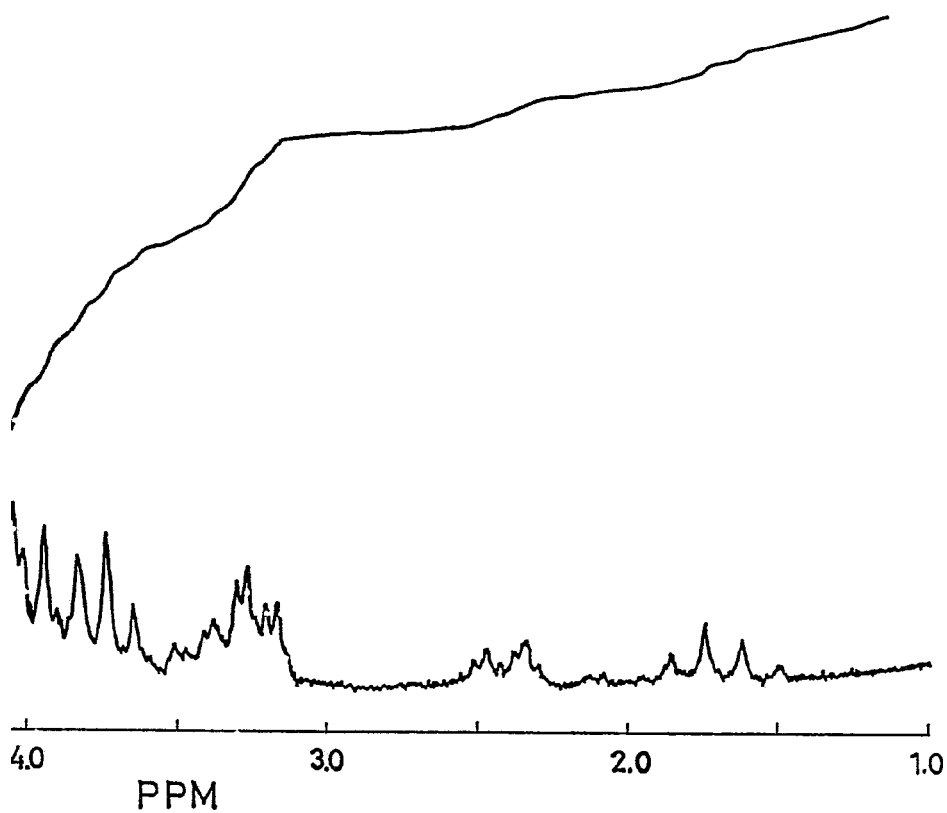
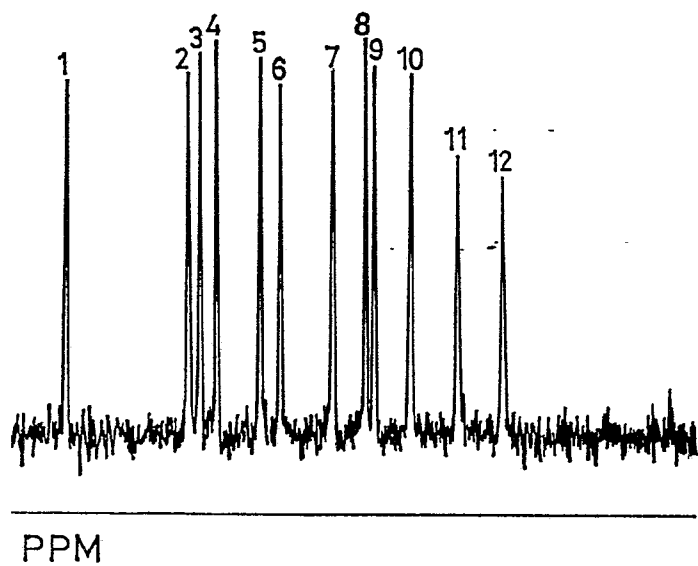
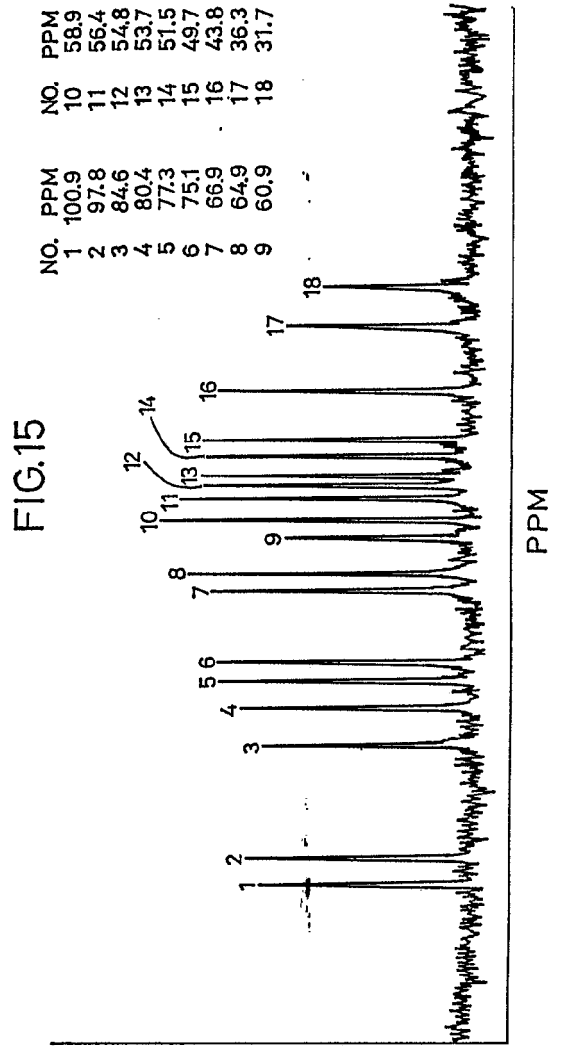
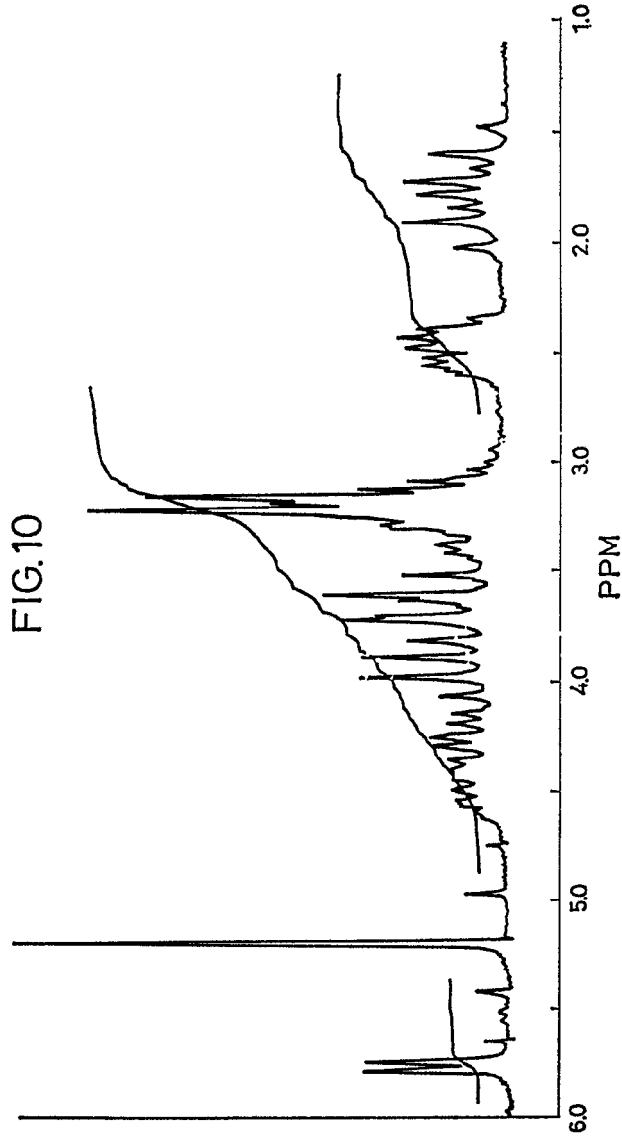


FIG. 14



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Octubre de 1.974  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.



ESCALA VARIABLE  
 Madrid, 24 de Octubre de 1.974  
 BERNARDO YNGEREA  
 P.P.

FIG.10

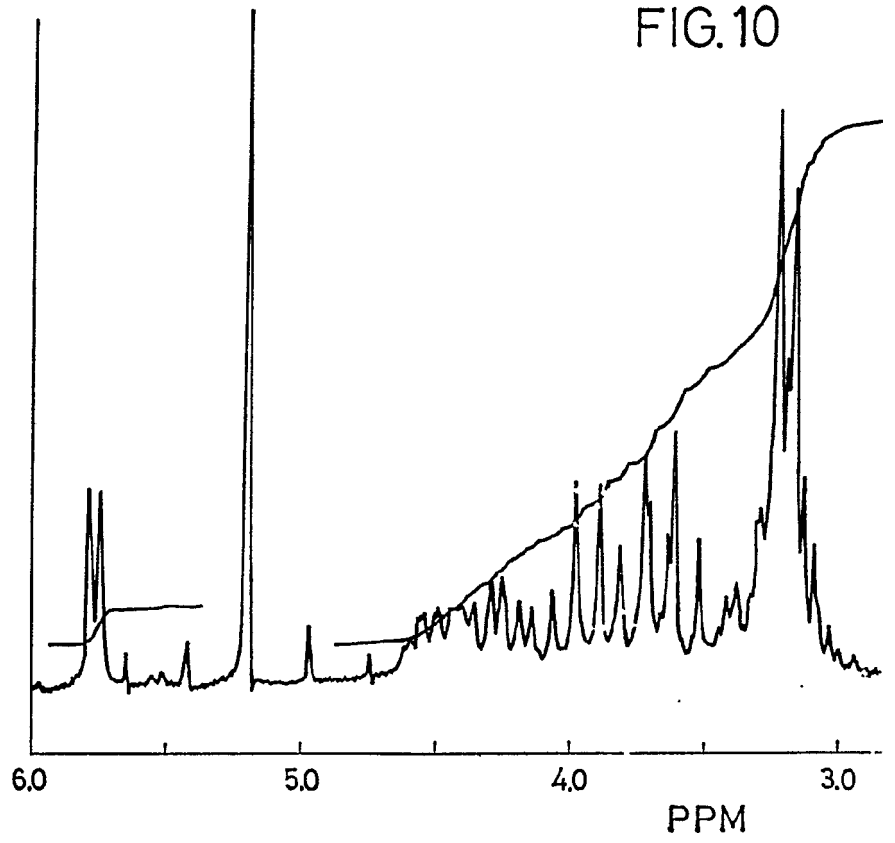


FIG.15

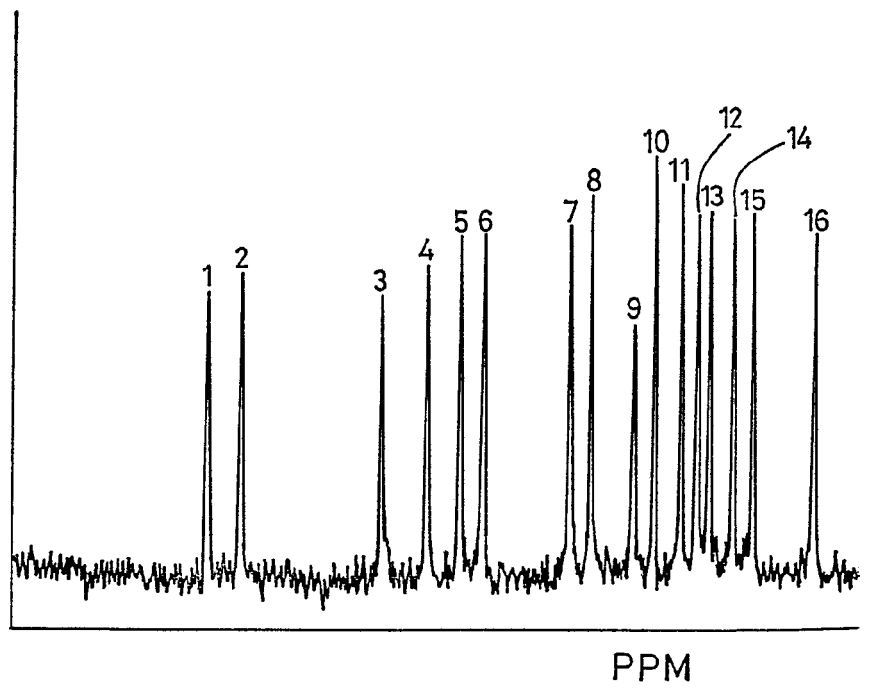


FIG.10

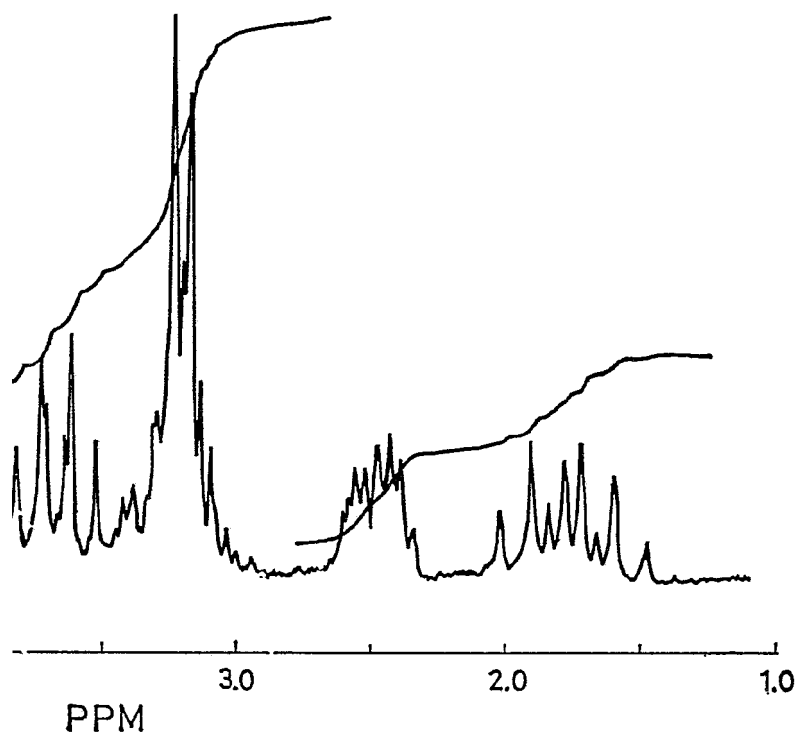
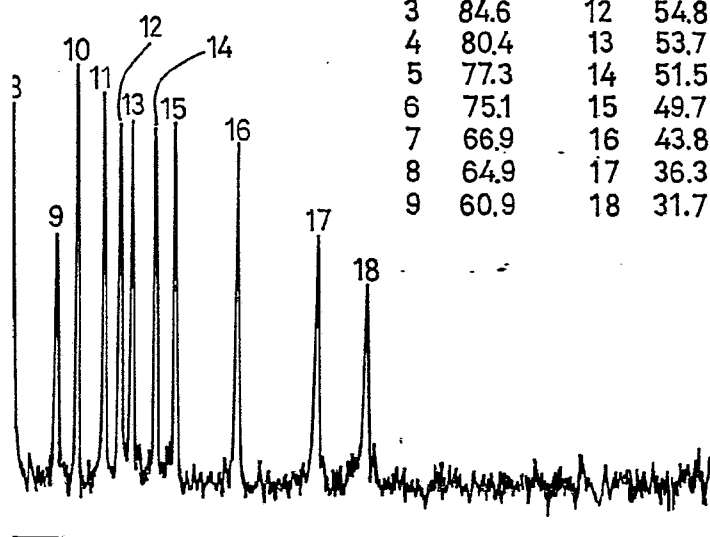


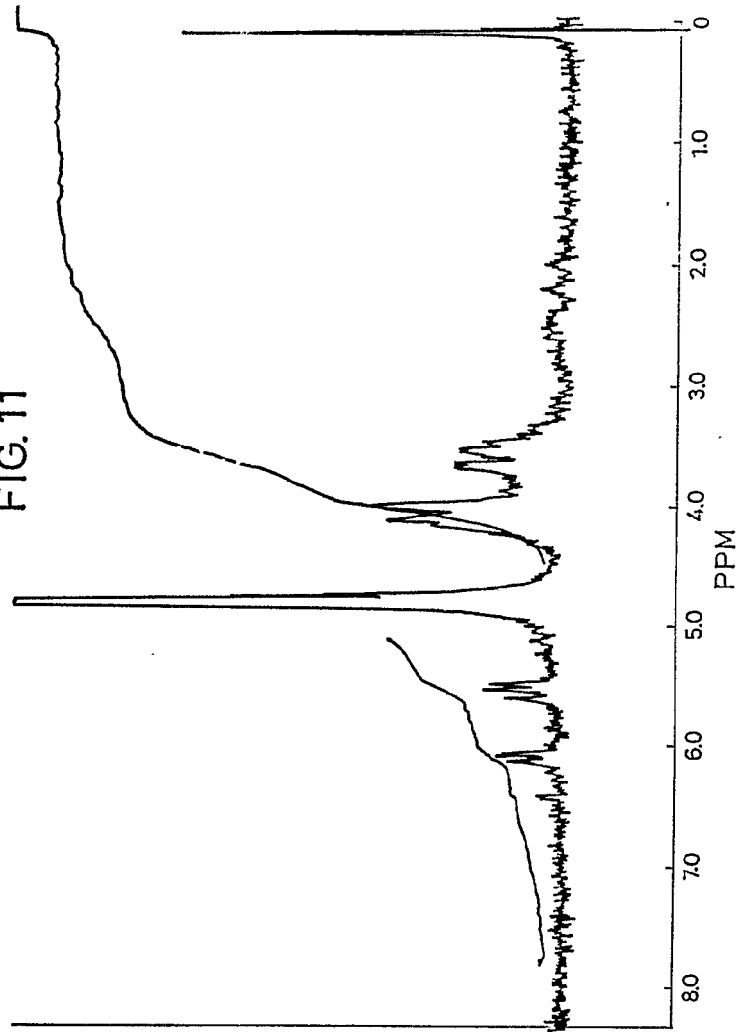
FIG.15

NO.	PPM	NO.	PPM
1	100.9	10	58.9
2	97.8	11	56.4
3	84.6	12	54.8
4	80.4	13	53.7
5	77.3	14	51.5
6	75.1	15	49.7
7	66.9	16	43.8
8	64.9	17	36.3
9	60.9	18	31.7



ESCALA VARIABLE  
 Madrid, 24 de Octubre de 1.974  
 BERNARDO UNGRÍA  
 P.P.

FIG. 11



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 Octubre 1.974  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.

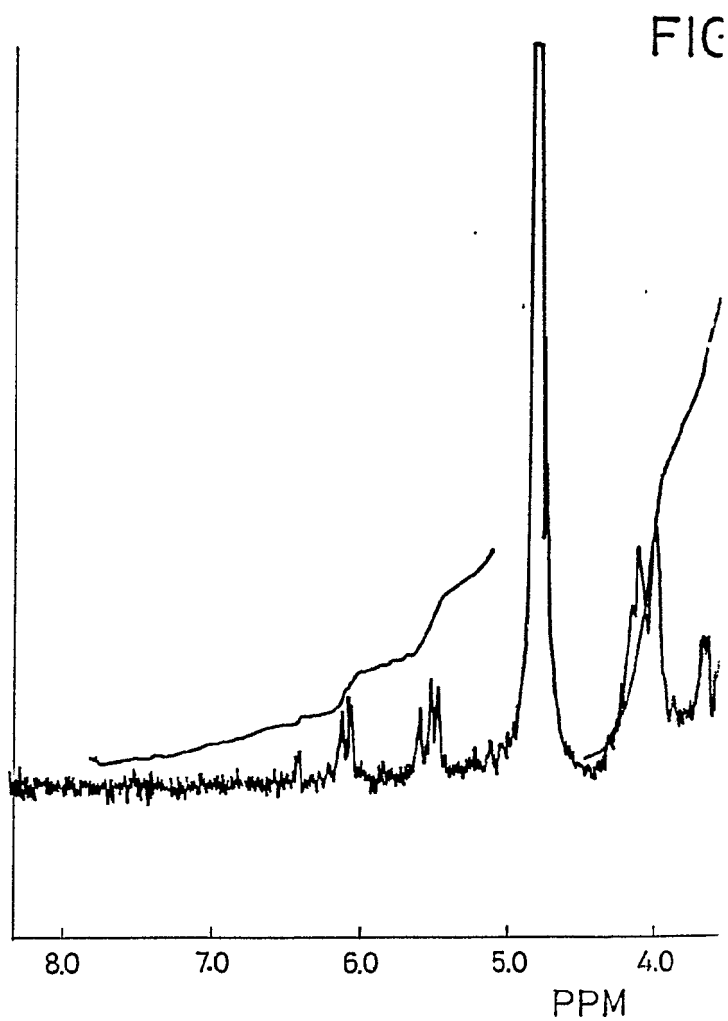
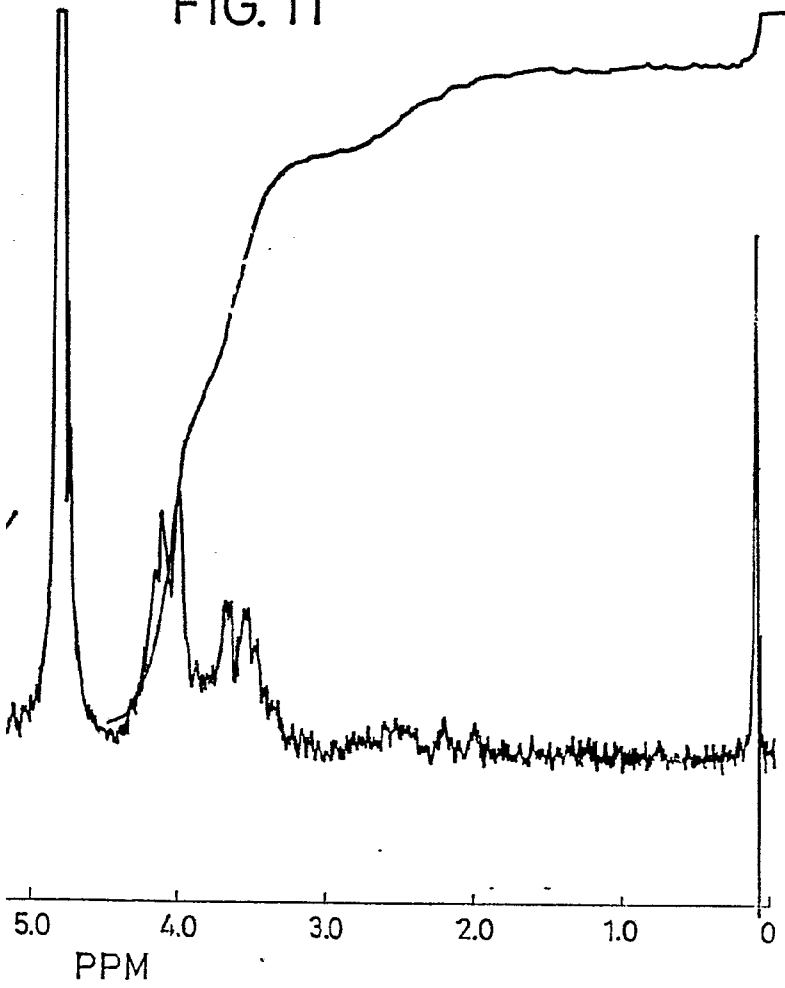


FIG. 11



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 Octubre 1.974  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.

FIG.12

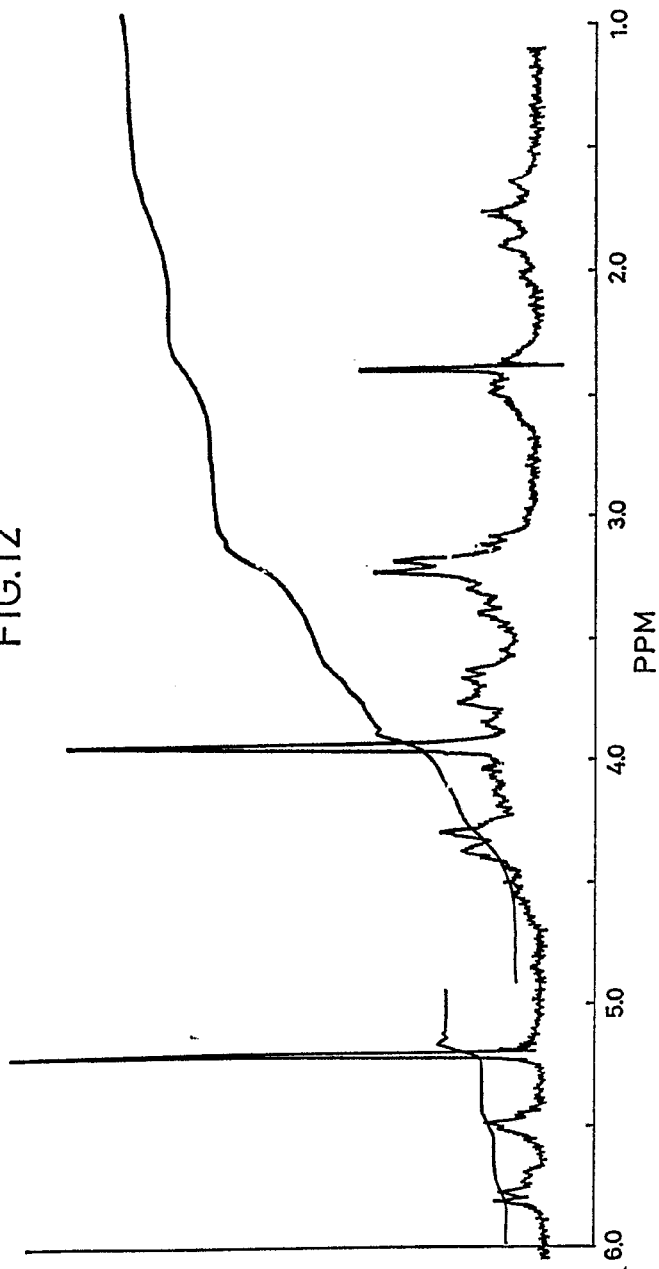
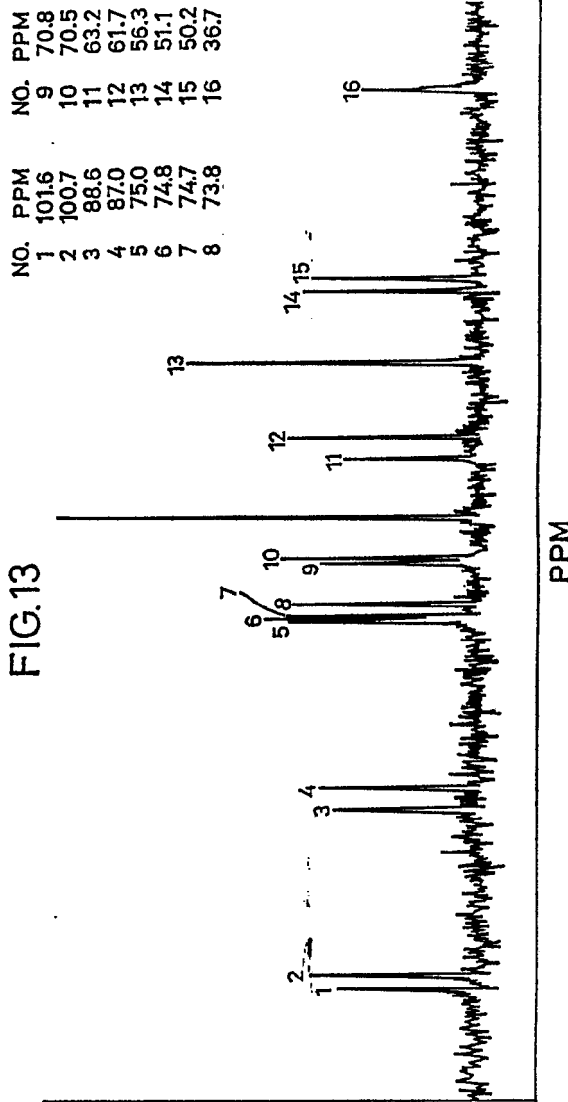


FIG.13



ESCALA VARIABLE  
 Madrid, 24 de Octubre de 1.974  
 BERNARDO UNGRIA  
 P.P.

FIG

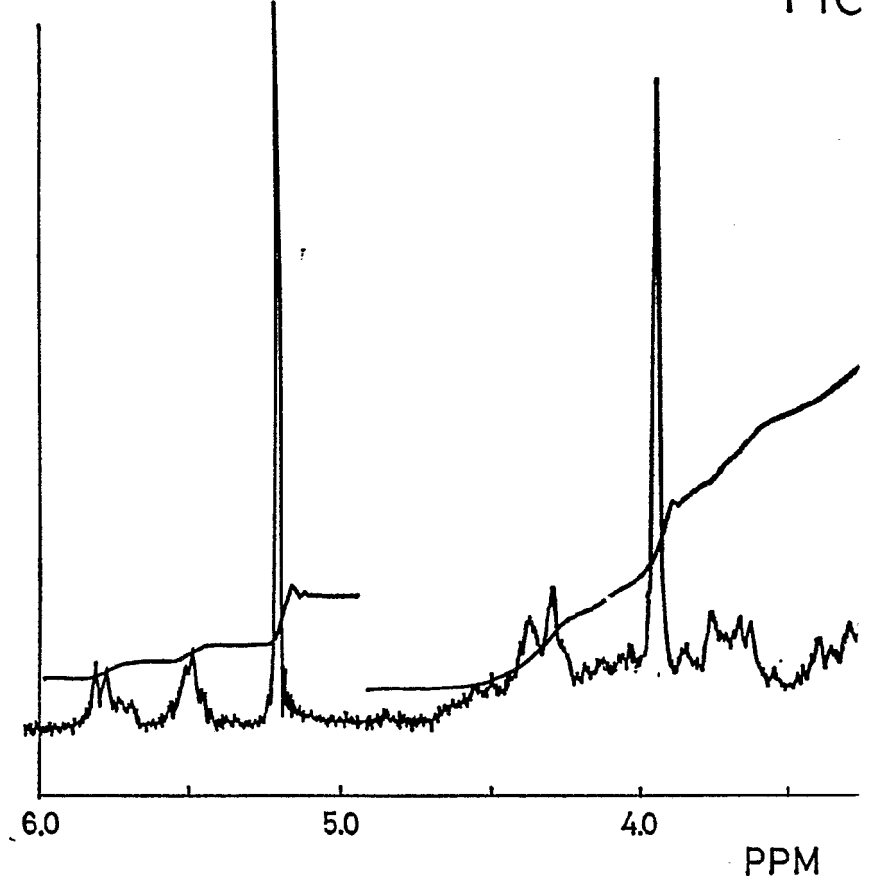


FIG.13

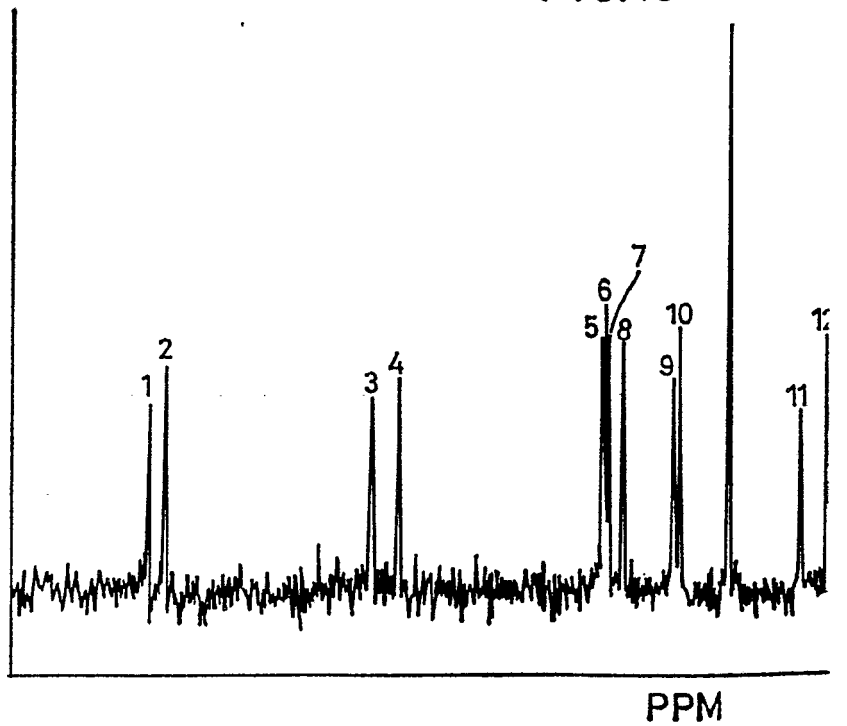
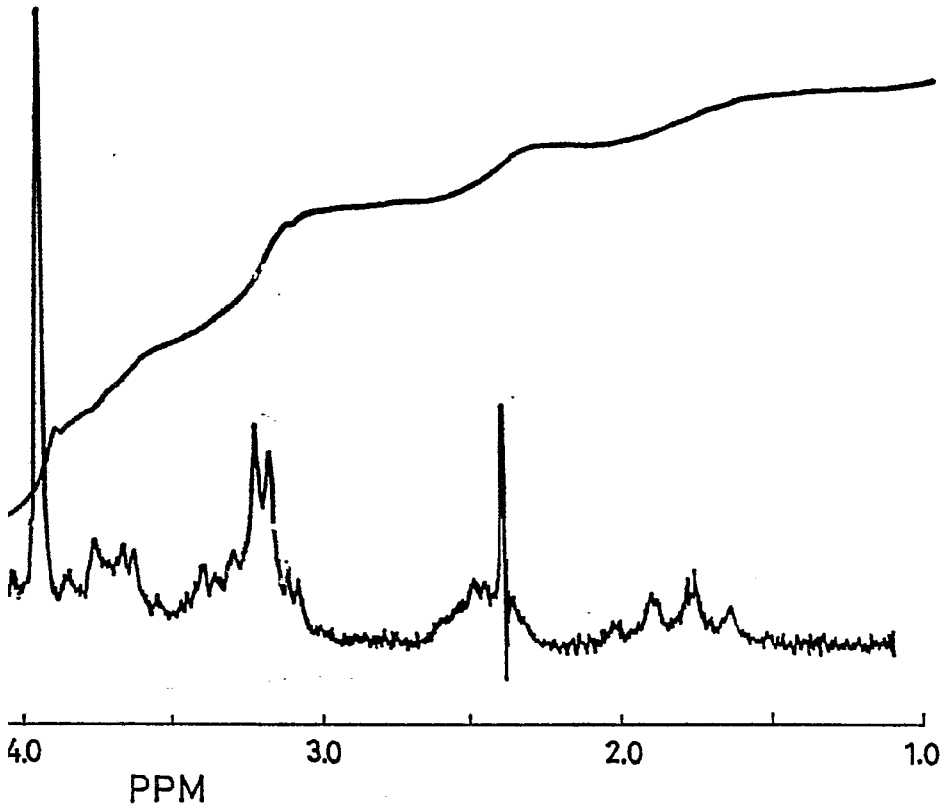
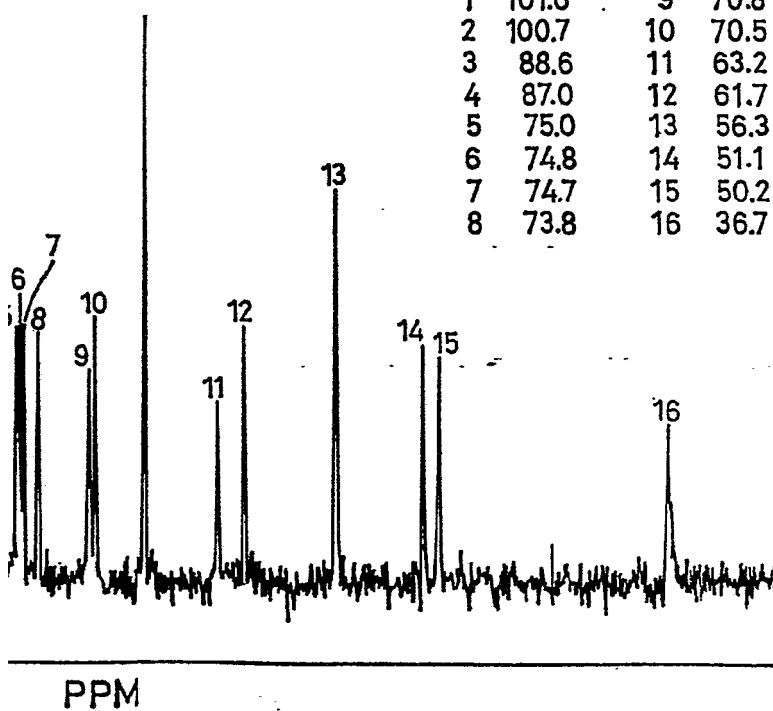


FIG.12



3.13

NO.	PPM	NO.	PPM
1	101.6	9	70.8
2	100.7	10	70.5
3	88.6	11	63.2
4	87.0	12	61.7
5	75.0	13	56.3
6	74.8	14	51.1
7	74.7	15	50.2
8	73.8	16	36.7



ESCALA VARIABLE  
 Madrid, 24 de Octubre de 1.974  
 BERNARDO UNGRIA  
 p.p.