

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial

Concedido el Registro de acuerdo
con los datos que figuran en la pre-
sente descripción y según el con-
tenido de la Memoria adjunta,

(11) NUMERO	(10) AI
(21) 468.181	
(22) FECHA DE PRESENTACION	
22-3-1978	



ESPAÑA

20 OCT. 1978

PATENTE DE INVENCION

(60) PRIORIDADES:	(61) PAIS	(62) PATENTE DE LA QUE ES DERIVADA
(31) NUMERO	(32) FECHA	
31580/77 133.051/77	24-3-1977 8-11-1977	Japón "

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DERIVADA
	C12D; A61K	

(54) TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN ANTIBIOTICO"

(71) SOLICITANTE (S)
KOWA COMPANY, LTD. (F6026-K17 (KOWA)/MS)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
6-29, 3-chome, Nishiki, Naka-ku, Nagoya, Aichi-ken, Japón

(72) INVENTOR (ES)
Toshihito Mori, Takeo Deushi, Akio Iwasaki, Takafumi Kunieda, Toshimi Mizoguchi, Kazuhiro Kamiya, Masahito Nakayama, Hisakatsu Ito, Takeshi Oda

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ (P.-68.542)

Jga

1 La presente invención se refiere a nuevos antibió-
ticos, a un procedimiento para preparar los antibióticos, y
a un cultivo biológicamente puro para uso en el procedimien-
to.

5 Los autores de la presente invención han aislado
diversos microorganismos del terreno, en búsqueda de anti-
bióticos producidos por estos microorganismos. En consecuen-
cia, han conseguido aislar una cepa productora de antibió-
tico perteneciente al genero Saccharopolyspora, del terreno
10 de Kobe, Japón. Por sus propiedades bacteriológicas, descri-
tas más adelante, se supuso que la cepa era un mutante na-
tural de Saccharopolyspora hirsuta, y se denominó Saccharo-
polyspora hirsuta KC-6606. Esta cepa KC-6606 se depositó
como FERM-P nº 3912 en el Microorganism Research Institute
15 (Instituto de investigación sobre microorganismos), Agency
of Industrial Science & Technology (Agencia de ciencia y
tecnología industriales), Japón; y como ATCC 20501 en la
American Type Culture Collection (Colección americana de
cultivos tipo).

20 Se ha establecido que los antibióticos producidos
por la cepa KC-6606 son sustancias no descritas en la biblio-
grafía, y que tienen acción antibacteriana contra bacterias
gram positivas, bacterias gram negativas y bacterias resis-
tentes a ácidos. Esta sustancia se denominó "sustancia KA-
25 -6606". También se ha hallado que por tratamiento con un
ácido inorgánico u orgánico aceptable en farmacia, la nueva
sustancia KA-6606 antibiótica se puede convertir fácilmen-
te a un antibiótico en forma de sal de adición de ácido.
Más investigaciones han conducido al descubrimiento de que
30 la sustancia KA-6606 se puede seguir separando en cuatro an-

1 tibióticos, KA-6606 I, KA-6606 II, KA-6606 III y KA-6606 IV,
 y que los KA-6606 I, KA-6606 III y KA-6606 IV se pueden con-
 vertir fácilmente en KA-6606 II por tratamiento con álcalis
 o ácidos.

5 (Por tanto, un objeto de la presente invención es
 proporcionar una nueva sustancia antibiótica KA-6606, y sus
 sales de adición de ácido.

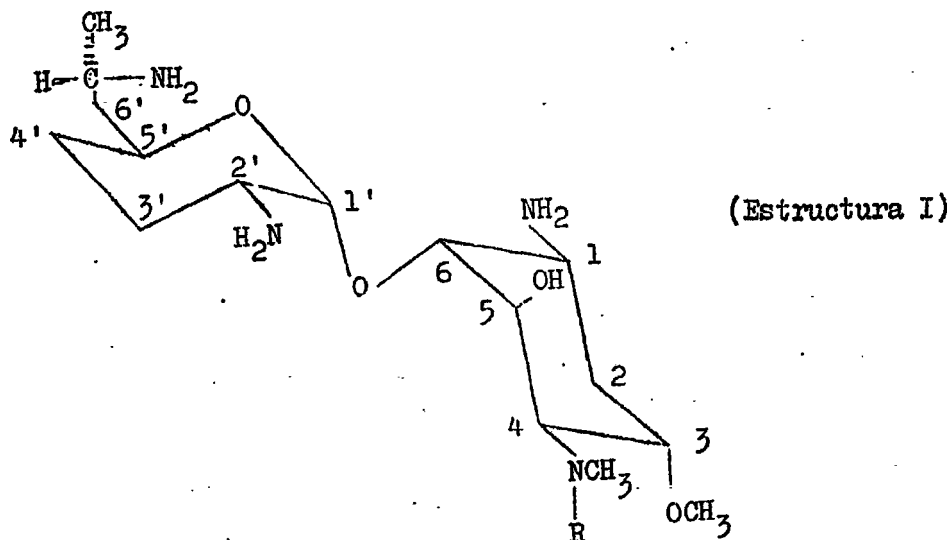
Otro objeto de la presente invención es proporcio-
 nar un procedimiento para preparar la sustancia KA-6606.

10 Aún otro objeto de la invención es proporcionar
 una composición antibiótica que comprende la sustancia KA-
 -6606 como ingrediente activo.

Otro objeto de la invención es proporcionar un
 cultivo biológicamente puro, útil para proporcionar la sus-
 tancia KA-6606.

15 Los objetos anteriores, y otros de la presente in-
 vención, junto con sus ventajas, serán más evidentes por la
 siguiente descripción.

La sustancia KA-6606 antibiótica de la presente
 20 invención se puede representar por la siguiente fórmula es-
 tructural:



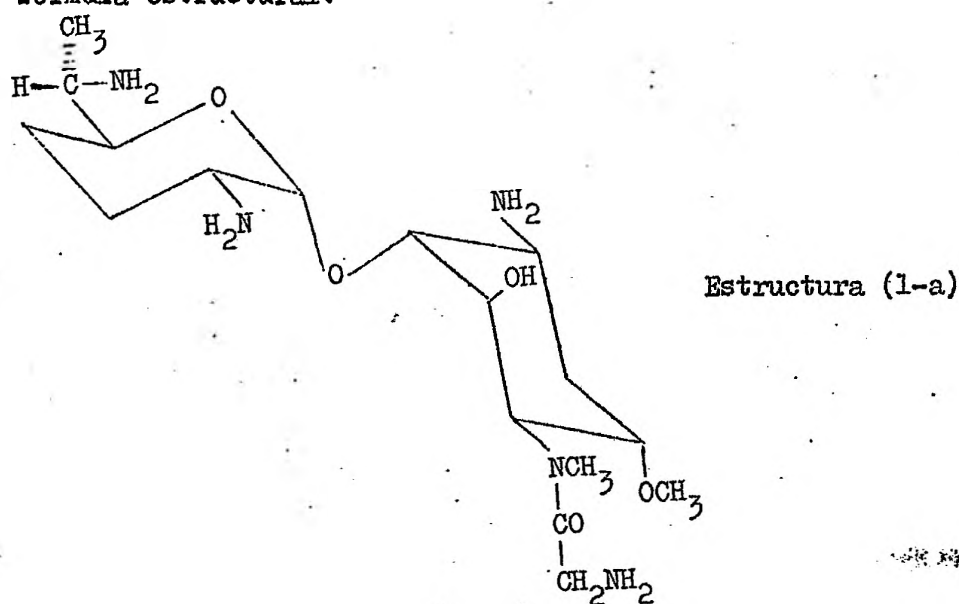
1 donde R representa un resto elegido del grupo que consta de hidrógeno, $-\text{COCH}_2\text{NH}_2$, $-\text{COCH}_2\text{NHCONH}_2$ y $-\text{COCH}_2\text{NHCHO}$. KA-6606 II es un compuesto de estructura (1) donde R es hidrógeno; KA-6606 I es un compuesto de estructura (1) donde R es

5 $-\text{COCH}_2\text{NH}_2$; KA-6606 III es un compuesto de estructura (1) donde R es $-\text{COCH}_2\text{NHCONH}_2$; y KA-6606 IV es un compuesto de estructura (1) donde R es $-\text{COCH}_2\text{NHCHO}$. La sustancia KA-6606 de estructura (1) que se produce por fermentación de la cepa productora de sustancia KA-6606, del género *Saccharopolyspora*, y que se acumula en el caldo de cultivo, contiene

10 las cuatro sustancias antes descritas. Si se desea, se puede dividir en esas cuatro sustancias, o en mezclas que contienen dos o tres de esas sustancias. Esas sustancias son útiles como antibióticos ya sea una a una o como tales mezclas. El tratamiento de KA-6606 I, KA-6606 III y KA-6606 IV con álcalis o ácidos produce KA-6606 II, de estructura (1) donde R es hidrógeno.

15 Las estructuras químicas y las propiedades físicas y químicas de KA-6606 I, II, III y IV se describen a continuación.

20 KA-6606 I se puede representar por la siguiente fórmula estructural:



1 y tiene la fórmula molecular, rotación específica y punto de fusión siguientes:

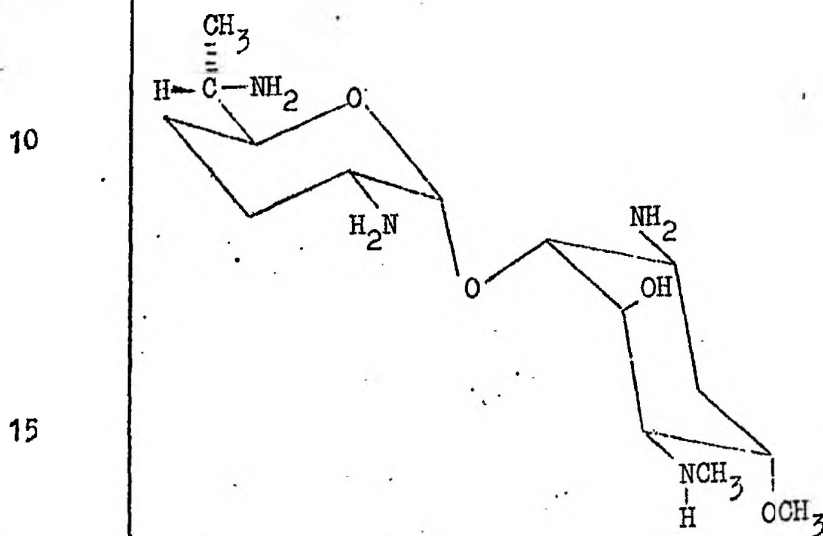
Fórmula molecular: $C_{17}H_{35}O_5N_5$

Rotación específica: $[\alpha]_D^{27} +104^\circ$ (c 1, H_2O)

5

Punto de fusión: 115 - 125°C

KA-6606 II se puede representar por la siguiente fórmula estructural



20 y tiene la fórmula molecular, rotación específica y punto de fusión siguientes:

Fórmula molecular: $C_{15}H_{32}O_4N_4$

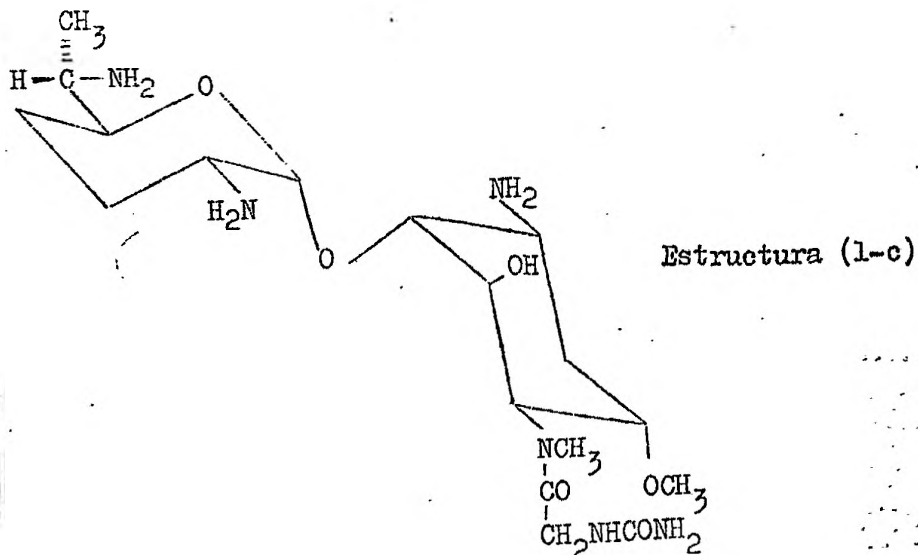
Rotación específica: $[\alpha]_D^{27} +139,5^\circ$ (c 1, H_2O)

Punto de fusión: 88 - 93°C

25 KA-6606 III se puede representar por la siguiente fórmula estructural:

30

1



5

10

y tiene la fórmula molecular, rotación específica y punto de fusión siguientes:

Fórmula molecular: $C_{18}H_{36}O_6N_6$

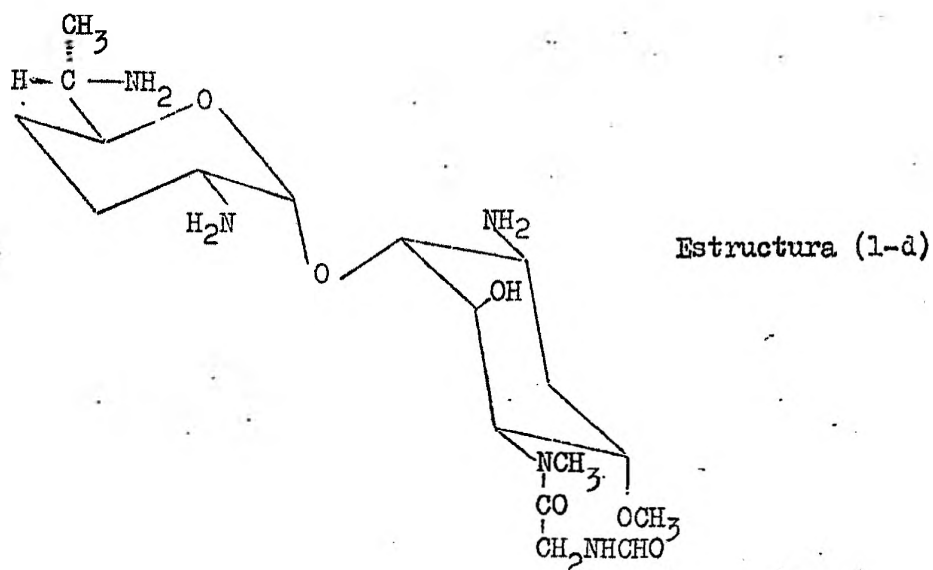
Rotación específica: $[\alpha]_D^{27} +103^\circ$ (c 1, H_2O)

15

Punto de fusión: 145 - 152°C

KA-6606 IV se puede representar por la siguiente fórmula estructural:

20



25

y tiene la fórmula molecular, rotación específica y punto de fusión siguientes:

30

050478

1

Fórmula molecular: $C_{18}H_{35}O_6N_5$

Rotación específica: $[\alpha]_D^{27} +101^\circ$ (c 1, H_2O)

Punto de fusión: 145 - 140°C

5

Los antibióticos conocidos que son más similares a las sustancias antibióticas KA-6606 de fórmula (1) son la fortimicina A, B y C (véanse las publicaciones de patente japonesa hechas públicas n.º 6487/78 (publicada el 20 de enero de 1978), 29789/75 (publicada el 25 de marzo de 1975), 145588/75 (publicada el 21 de noviembre de 1975), 18888/77 (publicada el 12 de febrero de 1977) y 83513/77 (publicada el 12 de julio de 1977), y la publicación de patente japonesa n.º 46311/77 (publicada el 24 de noviembre de 1977)). La fortimicina es un antibiótico producido por *Micromonospora* sp. cepa MK-70 (FERM-P n.º 1560; ATCC 21819) y, según se expone en *The Journal of Antibiotics*, vol. XXX, n.º 7, págs. 552-563, tiene una estructura química diferente de la sustancia KA-6606 de fórmula (1) antes dada, ya que la sustancia KA-6606 no tiene grupo hidroxilo en posición 2, y tiene una configuración diferente de un grupo amino en posición 1.

10

15

20

Como se describirá más adelante, la sustancia KA-6606 de la presente invención tiene mejor actividad antibacteriana que la fortimicina.

25

El nuevo antibiótico de la invención se puede producir fermentando la cepa productora de antibiótico KA-6606, del género *Saccharopolyspora*, y aislando la sustancia KA-6606 antibiótica del caldo de cultivo. Si se desea, se pueden separar uno o más de los antibióticos KA-6606 I, KA-6606 II, KA-6606 III y KA-6606 IV de la sustancia KA-6606 resultante.

30

1 La caracterización taxonómica de *Saccharopolyspora*
ra hirsuta KC-6606, un ejemplo típico de la cepa productora
de KA-6606, se muestra a continuación. Salvo que se especifique
otra cosa, sus propiedades en diversos medios de cultivo
5 fueron observadas por métodos ordinarios tras cultivarla
durante 21 días a 27°C. Los colores se expresaron para cultivo
maduro, según las clasificaciones del "Color Harmony Manual"
(Manual de armonía de colores)(Container Corp. Amer. 1958).

10

I. Propiedades morfológicas

Esta cepa forma hifas de sustrato e hifas aéreas en un medio de sales inorgánicas-agar de almidón. Las hifas
de sustrato (0,5 a 0,7 μ de diámetro) se extienden en largas
ramas, y están complicadamente entrelazadas unas con otras,
15 permitiendo usualmente que uno, muy raramente 2 a 3, cuerpos
tipo esporas de sustrato (0,8 a 1,2 μ de diámetro) se adhieran
al extremo del esporangióforo (aproximadamente 2,5 μ de longitud).
Ocasionalmente se halla en la colonia una típica fragmentación
nocardioforme. Las hifas aéreas (0,6 a 0,9 μ de diámetro) son
20 cortas, y las esporas maduras se observan como cadenas de 20
o más esporas, y segmentadas en cadenas tipo perla de esporas,
a menudo separadas por la longitud de hifas vacías. Las cadenas
de esporas se observan como bucles y espirales flojas. Las esporas
25 son de voladas a cilíndricas cortas (0,5-0,6 μ x 0,7-0,9 μ),
y las superficies de las esporas están cubiertas por una vaina que
tiene una estructura peluda.

20

25

II. Propiedades en diversos medios

1. Agar de sacarosa-nitrato

Crecimiento: bueno

30

050478

- 1 Hifas aéreas: buenas, pulverulentas, rosa con-
cha (5ba)
- Hifas de sustrato: butirosas, canela claro a
beige rosa (3gc - 4 gc)
- 5 Pigmento soluble: rosa pálido con tinte de ma-
rrón amarillento
2. Agar de glicerina-nitrato
- Crecimiento: moderado a bueno
- Hifas aéreas: buenas, pulverulentas, blancas (a)
- 10 Hifas de sustrato: butirosas, marfil claro (2ca)
- Pigmento soluble: amarillo pálido
3. Agar de glucosa-asparagina (inclinado)
- Crecimiento: moderado
- Hifas aéreas: ninguna
- 15 Hifas de sustrato: butirosas a gelatinosas,
ante (2fb)
- Pigmento soluble: ligeramente amarillo pálido
4. Agar de glicerina-asparagina (medio ISP nº 5)
- Crecimiento: moderado
- 20 Hifas aéreas: deficientes, pulverulentas, blan-
cas (a)
- Hifas de sustrato: gelatinosas, marfil claro
(2ca)
- Pigmento soluble: ligeramente amarillo pálido
- 25 5. Sales inorgánicas-agar de almidón (medio ISP nº 4)
- Crecimiento: bueno
- Hifas aéreas: deficientes, pulverulentas, blan-
cas (a)
- Hifas de sustrato: cartilaginosas, marfil cla-
ro a ante (2ca-2fb)

- 1 Pigmento soluble: ninguno
6. Agar de tirosina (inclinado, medio ISP n.º 7)
Crecimiento: moderado
Hifas aéreas: buenas, pulverulentas, blancas (a)
- 5 Hifas de sustrato: butirosas a gelatinosas,
marfil claro a ante (2ca-2fb)
Pigmento soluble: ligeramente amarillo pálido
7. Agar nutriente
Crecimiento: moderado
- 10 Hifas aéreas: ninguna
Hifas de sustrato: gelatinosas, ante (2fb)
Pigmento soluble: ninguno
8. Agar de extracto de levadura-extracto de malta
(medio ISP n.º 2)
- 15 Crecimiento: bueno
Hifas aéreas: escasas, pulverulentas, blancas
(a)
Hifas de sustrato: gelatinosas, bambú (2g)
Pigmento soluble: amarillo pálido
- 20 9. Agar de harina de avena (medio ISP n.º 3)
Crecimiento: deficiente
Hifas aéreas: ninguna
Hifas de sustrato: incoloras
Pigmento soluble: ninguno
- 25 10. Agar de peptona-extracto de levadura-hierro
(inclinado, medio ISP n.º 6)
Crecimiento: moderado
Hifas aéreas: deficientes, pulverulentas, blan-
cas (a)

30

050478

1

Hifas de sustrato: butirosas a gelatinosas,
amarillo melón claro (2ea)

Pigmento soluble: ligeramente amarillo pálido

11. Agar de Bennett

5

Crecimiento: bueno

Hifas aéreas: ninguna

Hifas de sustrato: gelatinosas, marfil claro
(2ca)

Pigmento soluble: ligeramente amarillo pálido

10

II. Propiedades fisiológicas

1. Temperatura de crecimiento: 18-45°C

2. Licuación de gelatina: positivo

3. Hidrólisis de almidón: positivo

4. Acción sobre la leche:

15

Coagulación: negativo

Peptonización: positivo

5. Producción de pigmento melanoide

Negativo en agar de tirosina y en agar de
peptona-hierro-extracto de levadura

20

6. Producción de nitrito a partir de nitrato y su
acumulación: positivo

Utilización de fuentes de carbono

Positivo: D-glucosa, D-fructosa, rafinosa, sa-
carosa, D-manita, galactosa, inulina
y salicina.

25

Negativo: L-arabinosa, D-xilosa, inosita, L-ram-
nosa, sorbita, lactosa y dulcita.

Como se ha descrito antes, la cepa KC-6606 forma
hifas de sustrato e hifas aéreas en diversos medios de agar.

30

Los cuerpos tipo esporas del sustrato se adhieren a las hi-

1 fas de sustrato, y las cadenas de esporas se adhieren a las
hifas de sustrato. Las hifas de sustrato se fragmentan oca-
sionalmente en elementos en forma de varilla. Las superfi-
cies de las esporas están cubiertas con una vaina que tiene
5 estructura peluda.

El análisis de su pared de célula mostró que con-
tiene ácido meso-diaminopimélico, y como azúcares arabinosa
y galactosa. Por tanto, se cree que la pared de célula de
esta cepa es de tipo IV.

10 El análisis de los ácidos grasos en la célula en-
tera mostró que no contiene LCN-A (lípidio característico de
las nocardias).

Las cepas conocidas que tienen estas característi-
cas se han buscado por el Bergey's Manual of Determinative
15 Bacteriology (Manual Bergey de Bacteriología determinati-
va), 8ª edición (1975). Como resultado, se ha hallado que
el género *Micropolyspora* es un género similar, y también
se puede citar como cepa similar el género *Saccharopolyspo-*
ra señalado por Lacey y Goodfellow (Journal of General Mi-
crobiology, vol. 88, página 75, 1975). La cepa usada en la
20 presente invención difiere de las cepas del género *Micro-*
polyspora en que tiene estructura peluda en las esporas, y
las cadenas de esporas contienen más de 20 esporas. Sin em-
bargo, es similar en morfología a esta última. Esto conduce
a la creencia de que la cepa KC-6606 pertenece al género
25 *Saccharopolyspora*. No ha habido ningún método establecido
para la clasificación sistemática del género *Saccharopolys-*
pora, debido a que solo se ha señalado una especie de géne-
ro.

30 Las diferencias entre la cepa KC-6606 y la Saccha-

1 Saccharopolyspora hirsuta se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	KC-6606	Saccharopolyspora hirsuta
5 Utilización de azúcares		
Xilosa	-	+
Ramnosa	-	+
Sorbita	-	+
Inosita	-	+
10 Producción y acumulación de nitrito	+	-

15 Dado que la cepa KC-6606 y la Saccharopolyspora hirsuta se corresponden bien una con otra, en propiedades básicas tales como la morfología, en propiedades en diversos medios de cultivo, y en propiedades fisiológicas, aunque difieren en la utilización de fuentes de carbono y en la formación y acumulación de nitrito, sería razonable considerar que estas cepas pertenecen a la misma especie.

20 En base a la anterior información, los autores de la presente invención han considerado la cepa en cuestión como un mutante natural de Saccharopolyspora, y le han nombrado Saccharopolyspora hirsuta cepa KC-6606. La cepa Saccharopolyspora hirsuta usada en la presente invención es susceptible de cambiar de características, y se puede mutar fácilmente por medios de mutación artificial, usando rayos ultravioleta, rayos X, diversos productos químicos tales como nitrosoguanidinas o mitomicina, etc. Todos los tales mutantes que tienen la capacidad de producir la sustancia
30 KA-6606 antibiótica pueden ser usados en la presente inven-

1 ción. Respecto a ello, la capacidad de cepas pertenecientes
a *Saccharopolyspora hirsuta* para producir antibióticos no
ha sido señalada.

5 Según la presente invención, se proporciona un cul-
tivo biológicamente puro de *Saccharopolyspora hirsuta* KC-
-6606, que tiene características identificadas como FERM-P
nº 3912 y ATCC 20501, y que también tiene la capacidad de
producir sustancia KA-6606 antibiótica por fermentación en
un medio nutriente acuoso que contiene una fuente de carbono,
10 no, una fuente de nitrógeno, y minerales.

Los medios de cultivo adecuados para uso en la
fermentación de la cepa productora de sustancia KA-6606 del
género *Saccharopolyspora* comprenden fuentes de carbono y de
nitrógeno y, como ingredientes opcionales, sales inorgánicas
15 (minerales), cantidades muy pequeñas de metales pesados,
etc.

Se pueden usar diversas fuentes de carbono, y son
ejemplos de fuentes de carbono preferidas el almidón, gli-
cerina, maltosa, dextrina, sacarosa, fructosa y melazas, que
20 se pueden usar solos o como mezclas adecuadas. También se
pueden usar hidrocarburos, ácidos orgánicos y aceites vege-
tales, si la cepa concreta puede utilizarlos como fuente de
carbono. Son ejemplos de fuentes de nitrógeno la harina de
soja, extracto de levadura, levadura seca, peptona, extrac-
25 to de carne, líquido de maceración de maíz, casaminoácido,
soluble de destilería, cloruro amónico, sulfato amónico,
urea y nitrato sódico, que se pueden usar solos o como mez-
clas adecuadas. Entre los ejemplos de sales inorgánicas se
incluyen el cloruro sódico, fosfato potásico, sulfato de
30 magnesio, cloruro cálcico, carbonato cálcico, hidróxido cálcico.

050478

1 cico, cloruro cobáltico, sulfato de cinc, cloruro férrico
y sulfato ferroso.

5 También se pueden añadir al medio de cultivo, según se requieran, sustancias inorgánicas y sustancias orgánicas (p.ej. aminoácidos) que ayuden al crecimiento de la cepa y favorezcan la producción de sustancia KA-6606. Cuando se emplea un método de cultivo con aireación, también se puede añadir al medio de cultivo un antiespumante tal como aceites de ácido graso, aceites de silicona y parafinas.

10 El cultivo se puede efectuar en un medio sólido. Sin embargo, preferiblemente, igual que en el procedimiento general para producir antibióticos, se usa un método de cultivo líquido, especialmente un método de cultivo sumergido. El cultivo se efectúa bajo condiciones aerobias, y la temperatura de cultivo es en general aproximadamente 20 a aproximadamente 40°C, de preferencia aproximadamente 27°C. Preferiblemente, durante el cultivo se mantiene el pH del medio de cultivo a aproximadamente 4 a aproximadamente 10. El periodo de cultivo es en general aproximadamente 2 días a aproximadamente 6 días.

20 Como resultado del cultivo, la sustancia KA-6606 se produce y acumula en el caldo de cultivo. Cuando la cantidad de sustancia KA-6606 producida en el caldo de cultivo llega a un máximo, se detiene el cultivo y se puede recoger la sustancia KA-6606 del caldo de cultivo.

25 Dado que la sustancia KA-6606 es una sustancia básica soluble en agua, pero solo ligeramente soluble en los disolventes orgánicos comunes, se puede separar del caldo de cultivo utilizando medios que se usan habitualmente para aislar y purificar antibióticos básicos solubles en agua.

30

050478

1 Por ejemplo, se puede usar un método de adsorción-desorción
usando una resina intercambiadora de iones, carbono activo,
celulosa, gel de sílice, alúmina, y un método de extracción
con butanol, alcohol amílico, etc, usando un ácido graso
5 superior como coadyuvante.

Por ejemplo, si el filtrado del caldo de cultivo
se carga en una columna de una resina intercambiadora de
cationes débilmente ácida, la sustancia KA-6606 se adsorbe
en ella. Luego se aísla la sustancia KA-6606 por elución
10 con un álcali o ácido 0,1-3,0 N, o diversas soluciones de
sal. El eluido activo resultante se liofiliza, para propor-
cionar un polvo crudo de sustancia KA-6606.

Son ejemplos de la resina intercambiadora de catio-
nes débilmente ácida, usada para recuperar la sustancia
15 KA-6606, el Amberlite IRC-50, IRC-84 y CG-50 (Rohm & Haas
Co.); y Diaion WK-10 y WK-20 (Mitsubishi Chemical Co., Ltd.).
Los álcalis que se pueden usar para la elución son solución
de hidróxido amónico, y una solución acuosa de hidróxido
sódico. Son ejemplos de los ácidos el ácido fórmico, ácido
20 clorhídrico y ácido sulfúrico. Las soluciones de sal pueden
ser, por ejemplo, una solución de carbonato amónico y una
solución de formiato amónico. Otro ejemplo del método de
recuperación comprende ajustar el pH del filtrado de caldo
de cultivo a 7 a 9, poner en contacto el filtrado con car-
25 bono activo para hacer que el KA-6606 se adsorba sobre el
carbono activo, y eluir la sustancia con agua ácida o ácido
clorhídrico-metanol.

La sustancia KA-6606 que se puede aislar por los
métodos antes descritos se puede dividir en KA-6606 I, II,
30 III y IV, disolviéndola en agua o hidróxido amónico diluí-

1 do, cargándola en una columna de un adsorbente tal como una
resina intercambiadora de iones débilmente ácida, del tipo
antes descrito, o un intercambiador de iones débilmente áci
do, tal como CM-Sephadex o CM celulosa, para hacer que la
5 sustancia se adsorba al adsorbente; y eluyendo luego con
una solución acuosa alcalina tal como hidróxido amónico di-
luído, o una solución acuosa de carbonato amónico o for-
miato amónico, por un método de gradiente o un método por
etapas. Según este método de separación se eluyen primero
10 varios componentes en cantidades de traza, y luego se elu-
yen, en este orden, KA-6606 IV y KA-6606 III como bases li-
bres. Por más elución se separan sucesivamente KA-6606 I y
KA-6606 II.

15 El KA-6606 I, II, III y IV resultantes se pueden
purificar por cromatografía en celulosa, gel de sílice, Se-
phadex (p.ej. LH 20), etc. Por ejemplo, se puede cromato-
grafiar en una columna de gel de sílice, usando una mezcla
(1:8:3) de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17%, co-
mo eluyente.

20 El KA-6606 I, II, III y IV que se pueden separar
por el método antes descrito están en forma de bases libres
y, según se desee, se pueden obtener en forma de una base
libre pura haciendo que se adsorban en una columna de una
resina intercambiadora de aniones fuertemente básica, tal
25 como Dowex 1x2 (Dow Chemical), eluyendo con agua desioni-
zada, recogiendo fracciones activas, y liofilizando las
fracciones recogidas.

30 Estos KA-6606 I, II, III y IV obtenidos como bases
libres se pueden convertir en sus sales de adición de áci-
do, por tratamiento con ácidos inorgánicos u orgánicos acep

1 tables en farmacia. Son ejemplos de tales ácidos los ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido bromhídrico, y ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido oxálico.

5 El KA-6606 I, KA-6606 III y KA-6606 IV se pueden convertir en KA-6606 II por tratamiento con álcalis o ácidos. La conversión se puede efectuar tratando el KA-6606 I, KA-6606 III y KA-6606 IV con una solución acuosa 0,1-4 N de un reactivo alcalino, tal como hidróxido sódico o hidróxido de bario, o con una solución acuosa 0,1-1 N de un reactivo ácido tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

10 En el caso de usar el reactivo alcalino, se puede añadir una resina intercambiadora de aniones fuertemente básica (p.ej. Amberlite IRA 400 (forma OH^-) o Dowex 1x2 (forma OH^-)), y la reacción se puede efectuar en estado de suspensión. Análogamente, cuando se usa el reactivo ácido se puede añadir una resina intercambiadora de cationes fuertemente ácida, tal como Amberlite IR 120 (forma H^+) o Dowex 50x8 (forma H^+), y se puede efectuar la reacción en estado de suspensión. La reacción se puede efectuar usualmente a aproximadamente 30 a 100°C, durante aproximadamente 0,5 a 3 horas.

15 Las propiedades físicas y químicas de los nuevos antibióticos KA-6606 I, II, III y IV, de estructuras (1-a) a (1-d), se describen a continuación.

20 KA-6606 I (base libre)

(1) Naturaleza : polvo blanco

(2) Fórmula molecular: $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{O}_5\text{H}_5$

(3) Análisis elemental:

30

050478

	C	H	N
Hallado (%) :	52,10	8,84	17,83
Calculado (%) :	52,42	9,06	17,99

(4) Peso molecular: 389 (espectro de masas)

5 (5) Punto de fusión: 115 - 125°C

(6) Rotación específica: $[\alpha]_D^{27} +104^\circ$ (c 1, H₂O)

(7) Espectro de absorción ultravioleta

A 220-360 nm no se muestra absorción característica, sino que solo existe una absorción terminal.

10 (8) Espectro de absorción infrarroja

El espectro de absorción infrarroja de una muestra en tableta de bromuro potásico es como se muestra en la Figura 1.

(9) Solubilidad

15 Muy fácilmente soluble en agua. Fácilmente soluble en metanol, ligeramente soluble en etanol. Insoluble en cloroformo, acetato de etilo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo.

(10) Reacción de color

20 Reacción de ninhidrina y reacción de Rydon Smith: positivas; reacción de Sakaguchi, reacción de maltol, reacción de cloruro férrico y reacción de Fehling: negativas.

(11) Estabilidad

25 Estable a pH de 3 a 8; gradualmente descompuesto y desactivado en medio básico y fuertemente ácido.

(12) Espectro de resonancia magnética nuclear

(δ_{D_2O} , ppm):

1,25 (3H, d, C-CH₃)

3,05 (3H, s, N-CH₃)

30 3,07 (2H, s, COCH₂N)

P-

1

3,40 (3H, s, $-\text{OCH}_3$)

5,00 (1H, d, H anómero)

(13) Espectro de masas (m/e):

389(M^+), 276, 258, 248, 230, 180, 143

5

(14) Cromatografía en papel

Valor Rf: 0,53

Papel de filtro: Whatman nº 1

Disolvente: una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)

10

(15) Cromatografía en capa delgada

Valor Rf	Disolvente
0,56	Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido amónico al 17% (4:2:5:2)
0,60	Cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (1:8:3)
0,10	Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)
0,76	Una capa superior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)

15

20

Se usó hoja de aluminio para CCD (gel de sílice 60 F₂₅₄ 0,2 mm) (Merck).

Derivado de tetra-N-acetilo de sustancia KA-6606 I

25

(1) Naturaleza: polvo cristalino incoloro

(2) Fórmula molecular: $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{O}_9\text{N}_5$

(3) Análisis molecular:

	C	H	N
Hallado (%) :	53,51	7,58	12,44
Calculado (%) :	53,85	7,77	12,56

(4) Peso molecular: 557 (espectro de masas)

(5) Punto de fusión: 160 - 166°C.

(6) Rotación específica: $[\alpha]_D^{25} +112^\circ$ (c 1, H_2O)

30

050478

1

(7) Espectro de resonancia magnética nuclear

 $(\delta_{D_2O}, \text{ppm})$ 1,10 (3H, d, C-CH₃)1,95, 2,00, 2,05, 2,07 (3H, s, COCH₃)

5

3,09 (3H, s, N-CH₃)3,42 (3H, s, O-CH₃)4,11 (2H, s, COCH₂N)

4,95 (1H, d, H anómero)

(8) Espectro de masas (m/e):

10

557(M⁺), 342, 314, 296, 227Sustancia KA-6606 II (base libre)

(1) Naturaleza: polvo blanco

(2) Fórmula molecular: C₁₅H₃₂O₄N₄

(3) Análisis elemental:

15

	C	H	N
Hallado (%) :	53,97	9,51	16,55
Calculado (%) :	54,19	9,70	16,85

(4) Peso molecular: 332 (espectro de masas)

(5) Punto de fusión: 88 - 93°C

20

(6) Rotación específica: $[\alpha]_D^{27} + 139,5^\circ$ (c 1, H₂O)

(7) Espectro de absorción ultravioleta

A 220 a 360 nm no se muestra absorción característica, sino que solo existe una absorción terminal.

(8) Espectro de absorción infrarroja

25

El espectro de absorción infrarroja de una muestra en tableta de bromuro potásico es como se muestra en la Figura 2.

(9) Solubilidad

30

Muy fácilmente soluble en agua; fácilmente soluble en metanol; ligeramente soluble en etanol; insoluble en clo

1 roformo, acetato de etilo; éter dietílico, hexano y éter de petróleo.

(10) Reacción de color

5 Reacción de ninhidrina y reacción de Rydon Smith: positivas; reacción de Sakaguchi, reacción de maltol, reacción de cloruro férrico y reacción de Fehling: negativas.

(11) Estabilidad

Estable a un pH de al menos 2; gradualmente descompuesto y desactivado en medio fuertemente ácido.

10 (12) Espectro de resonancia magnética nuclear

(δ_{D_2O} , ppm):

1,25 (3H, d, C-CH₃)

2,70 (3H, s, N-CH₃)

3,45 (3H, s, O-CH₃)

15 4,95 (1H, d, H anómero)

(13) Espectro de masas (m/e):

332(M⁺), 283, 219, 119, 143

(14) Cromatografía en papel

Valor Rf: 0,86

20 Papel de filtro: Whatman n.º 1

Disolvente: una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)

(15) Cromatografía en capa delgada

25	Valor Rf	Disolvente
	0,57	Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido amónico al 17% (4:5:2:5)
	0,52	Cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (1:8:3)
	0,16	Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)

30

050478

1 Valor Rf Disolvente
 0,80 Una capa superior de cloroforno-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)
 Se usó como placa hoja de aluminio para CCD (gel de sílice 60 F₂₅₄ 0,2 mm) (Merck Co.)

5 Derivado de penta-N-acetilo de sustancia KA-6606 II

(1) Naturaleza: agujas incoloras

(2) Fórmula molecular: $C_{23}H_{40}O_8N_4 \cdot H_2O$

(3) Análisis elemental:

		C	H	N
10	Hallado (%) :	52,99	7,65	10,52
	Calculado (%) :	53,27	8,16	10,80

(4) Peso molecular: 500 (espectro de masas)

(5) Punto de fusión: 139 - 141°C

15 (6) Rotación específica: $[\alpha]_D^{22} +52^\circ$ (c 1, H₂O)

(7) Espectro de resonancia magnética nuclear

(δ_{D_2O} , ppm):

1,09 (3H, d, C-CH₃)

1,98, 1,99, 2,01, 2,13 (3H, s, CO-CH₃)

20 3,10 (3H, s, N-CH₃)

3,40 (3H, s, O-CH₃)

4,96 (1H, d, H anómero)

(8) Espectro de masas (m/e):

500(M⁺), 303, 271, 257, 227

25 Sustancia KA-6606 III (base libre)

(1) Naturaleza: polvo blanco

(2) Fórmula molecular: $C_{18}H_{36}O_6N_6$

(3) Análisis elemental:

		C	H	N
30	Hallado (%) :	49,51	8,11	19,10

1

C

H

N

Calculado (%) : 49,99 8,39 19,43

(4) Peso molecular: 432 (espectro de masas)

(5) Punto de fusión: 145 - 152°C

5

(6) Rotación específica: $[\alpha]_D^{27} +103^\circ$ (c 1, H₂O)

(7) Espectro de absorción ultravioleta

A 220 a 360 nm no se muestra absorción específica, sino que solo existe una absorción terminal.

(8) Espectro de absorción infrarroja

10

El espectro de absorción infrarroja de una muestra en tableta de bromuro potásico es como se muestra en la Figura 3.

(9) Solubilidad

15

Muy fácilmente soluble en agua; fácilmente soluble en metanol; ligeramente soluble en etanol; insoluble en cloroformo, acetato de etilo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo.

(10) Reacción de color

20

Reacción de ninhidrina y reacción de Rydon Smith: positivas; reacción de Sakaguchi, reacción de maltol, reacción de cloruro férrico, reacción de Fehling: negativas.

(11) Estabilidad

Estable a pH de 3 a 8; gradualmente descompuesto y desactivado en medio básico y fuertemente ácido.

25

(12) Espectro de resonancia magnética nuclear

(δ_{D_2O} , ppm):

1,21 (3H, d, C-CH₃)

3,07 (3H, s, N-CH₃)

3,40 (3H, s, O-CH₃)

30

4,06 (2H, s, CO-CH₂-N)

050478

P-

4,95 (1H, d, H anómero)

(13) Espectro de masas (m/e):

432(M⁺), 273, 219, 194, 173, 143

(14) Cromatografía en papel

Valor Rf: 0,27

Papel de filtro: Whatman n.º 1

Disolvente: una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)

(15) Cromatografía en capa delgada

Valor Rf	Disolvente
0,55	Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido amónico 17% (4:5:2:5)
0,64	Cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (1:8:3)
0,06	Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)
0,77	Una capa superior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)

Se usó como placa hoja de aluminio para CCD (gel de sílice 60 F₂₅₄ 0,2 mm) (Merck).

Sustancia KA-6606 IV (base libre)

(1) Naturaleza: polvo blanco

(2) Fórmula molecular: C₁₈H₃₅O₆N₅

(3) Análisis elemental:

	C	H	N
Hallado (%) :	51,39	8,08	16,41
Calculado (%) :	51,78	8,45	16,77

(4) Peso molecular: 417 (espectro de masas)

(5) Punto de fusión: 135 - 140°C

(6) Rotación específica: $[\alpha]_D^{27} +101^\circ$ (c,1, H₂O)

30

050478

1

(7) Espectro de absorción ultravioleta

A 220 a 360 nm no se muestra absorción específica, sino que solo existe una absorción terminal.

5

(8) Espectro de absorción infrarroja

El espectro de absorción infrarroja de una muestra en tableta de bromuro potásico es como se muestra en la Figura 4.

10

(9) Solubilidad

Muy fácilmente soluble en agua; fácilmente soluble en metanol; ligeramente soluble en etanol; insoluble en cloroformo, acetato de etilo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo.

15

(10) Reacción de color

Reacción de ninhidrina y reacción de Rydon Smith: positivas; reacción de Sakaguchi, reacción de maltol, reacción de cloruro férrico y reacción de Fehling: negativas.

20

(11) Estabilidad

Estable a un pH de 3 a 8; gradualmente descompuesto y desactivado en medio básico y fuertemente ácido.

25

(12) Espectro de resonancia magnética nuclear

(δ_{D_2O} , ppm):

1,23 (3H, d, C-CH₃)

3,09 (3H, s, N-CH₃)

3,40 (3H, s, O-CH₃)

4,18 (2H, s, CO-CH₂-N)

5,08 (1H, d, H anómero)

30

(13) Espectro de masas (m/e):

417(M⁺), 304, 276, 258, 219, 173, 143

(14) Cromatografía en papel

Valor Rf: 0,55

050478

1

Papel de filtro: Whatman n.º 1

Disolvente: una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)

5

(15) Cromatografía en capa delgada

Valor Rf	Disolvente
0,56	Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido amónico al 17% (4:5:2:5)
0,66	Cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (1:8:3)
10 0,16	Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)
0,76	Una capa superior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)

15

Se usó como placa hoja de aluminio para CCD (gel de sílice 60 F₂₅₄ 0,2 mm) (Merck).

Los valores Rf por cromatografía en papel, de los nuevos antibióticos de KA-6606 I, II, III y IV, se muestran en la siguiente Tabla 1, en comparación con los de antibióticos conocidos. Unos datos similares, obtenidos por cromatografía en capa delgada, se muestran en la siguiente Tabla 2.

20

Tabla 1

Valores Rf de las sustancias KA-6606 y antibióticos conocidos

25

Sistema disolvente: una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (2:1:1)

Papel de filtro: Whatman n.º 1

30

050478

1

Antibióticos	Valor Rf
KA-6606 I	0,53
KA-6606 II	0,86
5 KA-6606 III	0,27
KA-6606 IV	0,55
Gentamicina C ₁	0,59
Gentamicina C ₂	0,35
Gentamicina C _{1a}	0,12
10 Sagamicina	0,49
Sisomicina	0,12
Verdamicina	0,35
G-52	0,49
Fortimicina A	0,32
15 Fortimicina B	0,89
Otros *	0,0 - 0,05

* Otros representa Kanamicina A, B y C, Paromomicina, Neomicina A, B y C, Butirosina A y B, Lividomicina A y B, Ribostamicina, Xilostatina, Gentamicina A y B, Tobramicina, Apramicina, Sorbicitina, sustancia antibiótica 460, Higromicina o Destomicina.

20

Tabla 2

Valores Rf de las sustancias KA-6606 y antibióticos conocidos

25

Sistema disolvente

Disolvente I : Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido amónico al 17% (4:5:2:5)

Disolvente II: Cloroformo-metanol-hidróxido amónico al 17% (1:8:3)

30

050478

1

Placa

Hoja de aluminio para CCD (gel de sílice 60 F₂₅₄
0,2 mm) (Merck)

5

Antibióticos	Valor Rf	
	Disolvente I	Disolvente II
KA-6606 I	0,56	0,60
KA-6606 II	0,57	0,52
KA-6606 III	0,55	0,64
KA-6606 IV	0,56	0,66
Gentamicina C ₁	0,52	0,40
Gentamicina C ₂	0,51	0,44
Gentamicina C _{1a}	0,43	0,34
Sagamicina	0,45	0,32
Fortamicina A	0,53	0,56
Fortamicina B	0,60	0,70

10

15

Los espectros antibióticos de los nuevos antibióticos KA-6606 I, II, III y IV se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

20

	Sustancias KA-6606				Fortimicina A	Amikacina
	I	II	III	IV		
Staph aureus 209P	0,4	25	3	6	0,8	0,8
SMITH	0,2	12	1,5	3	0,8	0,4
B. anthracis	0,2	6	0,8	1,5	0,8	0,2
cereus	1,5	50	6	12	6	1,5
subtilis	0,2	6	0,8	1,5	1,5	0,4
Micrococcus luteus	0,4	>100	-	-	6	12
Strept. faecalis	25	>100	>25	>50	100	100
E. coli NIHJ	1,5	50	12	25	6	3
K-12 ML 1410	3	>100	>25	50	12	3

25

30

050478

(continúa)

Tabla 3 (continuación)

	Sustancias KA-6606				Fortimi- cina A	Amika cina
	I	II	III	IV		
K-12 ML 1410						
R-81 ^{I)}	12	>100	25	50	50	12
R-82 ^{II)}	3	>100	12	50	12	3
R-101 ^{III)}	3	>100	25	50	6	6
Prot. vulgaris OX-19	1,5	100	6	6	6	1,5
Kleb. pneumoniae						
PCI-602	1,5	>100	12	12	6	1,5
Ps. aeruginosa						
SHIBATA	3	>100	25	25	12	0,8
Nº 12	0,4	100	1,5	3	1,5	0,4
TI-13	3	>100	>25	>50	6	1,5
A ₃	3	>100	25	50	12	0,2
K-11 ^{I)}	6	>100	>25	>50	12	1,5
315 ^{IV)}	6	>100	>25	>50	12	25
Providencia sp. V)	1,5	>100	25	50	6	3
Serratia sp.	1,5	100	6	12	3	1,5
Mycobacterium smeg matis 607	0,4	>100	>25	12	0,8	0,8

I) 3'-fosfotransferasa I

II) 3'-fosfotransferasa II

III) 2"-nucleotidiltransferasa

IV) 6'-acetiltransferasa

V) 2'-acetiltransferasa

Las toxicidades agudas del KA-6606 I, II, III y IV de la presente invención, determinadas usando ratones, son como sigue:

1

	KA-6606 I	KA-6606 II	KA-6606 III	KA-6606 IV
LD ₅₀ (mg/kg)	iv. 50-100	> 400	> 200	> 200
	sc. 200-400	>1,000	>800	>800

5

Según la presente invención se puede proporcionar también una composición antibiótica que comprende (1) una cantidad eficaz de al menos un compuesto elegido del grupo que consta de las sustancias KA-6606 de la presente invención y sus sales de adición de ácido aceptables en farmacia, y (2) un diluyente o vehículo aceptable en farmacia.

10

La cantidad del compuesto (1) es, por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99,5% en peso, basado en el peso de la composición.

15

La composición antibiótica de la presente invención puede estar en cualesquiera de las formas de dosificación usualmente empleadas, pero se prefieren especialmente las preparaciones para inyección y cápsulas.

20

Preferiblemente, como los antibióticos básicos solubles en agua conocidos, se prepara un inyectable llenando un vial con un polvo liofilizado del antibiótico, preferiblemente junto con un estabilizador, y en el uso se disuelve el contenido del vial en un líquido disolvente, para administración.

25

Entre los diluyentes o vehículos se incluyen, por ejemplo, diluyentes líquidos tales como agua destilada para inyección y solución isotónica fisiológica, y vehículos sólidos tales como lactosa, almidón, azúcar blanco, glucosa, celulosa cristalina, carbonato cálcico, caolín, D-manita, metasilicato aluminato de magnesio, sulfato cálcico, fosfato cálcico y bentonita. También se prefiere la adición de

30

1 estabilizadores tales como bisulfito sódico ácido.

La dosis de la sustancia antibiótica de la presente invención se puede elegir adecuadamente, y es, por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg/día.

5 Así, según la presente invención, se pueden proporcionar composiciones antibióticas para animales distintos de los seres humanos, tales como aves de corral, animales domésticos y peces de piscifactoría, y composiciones antibióticas para el hombre. Estas composiciones son útiles como agentes antibacterianos que tienen amplio espectro antibacteriano.

10 La sustancia KA-6606 de la presente invención también es útil como material para producir sus derivados.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención en más detalle.

15

Ejemplo 1

20 Se preparó un medio de cultivo a partir de 3% de almidón, 15% de harina de soja, 0,5% de líquido de maceración de maíz, 0,2% de extracto de levadura, 0,05% de sulfato de magnesio, 0,3% de cloruro sódico, 0,3% de carbonato cálcico, 0,001% de cloruro cobáltico hexahidratado, y agua corriente, se ajustó a un pH de 7,0, y se esterilizó. La cepa KC-6606 fué inoculada en el medio de cultivo, y cultivada a 27°C durante aproximadamente 50 horas, para formar un primer cultivo de siembra.

25

30 Doscientos mililitros del primer cultivo de siembra se transfirieron a un fermentador de 200 litros, que contenía 100 litros del mismo medio estéril que antes, y 1% de aceite de semilla de algodón. El cultivo se efectuó mientras se agitaba a 225 rpm, con un caudal de aire de 50 li-

30

050478

1 tros por minuto, a 27°C, durante 4 días.

5 Tras el cultivo, se añadió ácido sulfúrico al caldo de cultivo para ajustar su pH a 2,0. Luego se filtró el caldo de cultivo con uso de Dikalyte (Dikalyte Orient Co.)
10 como coadyuvante de filtración. Se añadió solución acuosa diluida de hidróxido sódico al filtrado, para ajustar su pH a 8,0, y se pasó a través de una columna de una resina intercambiadora de cationes, Amberlite IRC-50 (forma NH_4^+) (el efluente se despreció). Tras lavar la columna de resina con agua desionizada, la sustancia activa adsorbida fué eluida con hidróxido amónico 1N. La actividad del eluido se determinó por un método con disco de papel, usando una placa de agar de Bacillus subtilis. Las fracciones que tenían actividad se reunieron, y se concentraron a aproximadamente 15 50 ml bajo presión reducida. El concentrado se liofilizó, proporcionando 8,8 g de un polvo crudo de sustancia KA-6606.

20 Ocho gramos del polvo crudo se disolvieron en 50 ml de agua destilada. Tras ajustar el pH a 7,0, la solución se pasó a través de una columna (3 x 150 cm) de una resina intercambiadora de cationes, Amberlite CG-50 I (forma NH_4^+).
25 Tras lavar con agua desionizada, las porciones activas se obtuvieron por elución en gradiente, entre 5 l de hidróxido amónico 0,01N y 5 l de hidróxido amónico 1N, a un caudal de 150 ml/hora, y todas las fracciones, cada una de las cuales contenía 25 ml, se determinaron por el método del disco de papel. Las fracciones que contenían ingredientes correspondientes a KA-6606 I, fracciones que contenían ingredientes correspondientes a KA-6606 II, fracciones que contenían ingredientes correspondientes a KA-6606 III y fracciones que
30 contenían ingredientes correspondientes a KA-6606 IV, res-

1 pectivamente, se recogieron y liofilizaron, proporcionando
80 mg de un polvo crudo que contenía KA-6606 I, 16 mg de
un polvo crudo que contenía KA-6606 II, 120 mg de un polvo
crudo que contenía KA-6606 III, y 794 mg de un polvo crudo
5 que contenía KA-6606 IV, respectivamente.

El KA-6606 I y KA-6606 II liofilizados se disol-
vieron, respectivamente, en agua, y tras ajustar el pH a
7,0 cada una de las soluciones se pasó a través de una co-
luna (1 x 150 cm) de una resina intercambiadora de aniones,
10 Dowex lx2 (forma OH). La porción activa se reveló con agua
desionizada, y las fracciones activas se reunieron y liofi-
lizaron, proporcionando 40 mg de KA-6606 I como base libre
pura, y 10 mg de KA-6606 II como base libre pura.

Por separado, 120 mg del polvo crudo que contenía
15 sustancia KA-6606 III se disolvieron en agua, y la solución
se pasó a través de una columna (2 x 60 cm) de gel de síli-
ce, rellena con una mezcla disolvente de cloroformo-metanol-
-hidróxido amónico al 17% (1:8:3), para eluir el KA-6606
III con el disolvente anterior. Las fracciones eluidas co-
20 rrespondientes se concentraron bajo presión reducida y se
liofilizaron, proporcionando 70 mg de un polvo blanco de
KA-6606 III. El tratamiento de 794 mg del polvo crudo que
contenía KA-6606 IV, de la misma manera, proporcionó 50 mg
de un polvo blanco de KA-6606 IV.

25 Cada uno de los productos liofilizados se disolvió
en agua, y tras ajustar el pH a 7,0 la solución se cromato-
grafió en una columna (1 x 10 cm) de una resina intercambia-
dora de aniones, Dowex lx2 (forma OH⁻), y la porción acti-
va se eluyó con agua desionizada. Las fracciones activas
30 se recogieron y liofilizaron, proporcionando 12 mg de

050478

1 KA-6606 III como base libre pura, y 8 mg de KA-6606 IV como base libre pura, respectivamente.

Ejemplo 2

5 Se preparó un medio de cultivo a partir de 2% de almidón, 1% de harina de soja, 0,5% de líquido de maceración de maíz, 0,05% de sulfato de magnesio, 0,3% de cloruro sódico, 0,3% de carbonato cálcico y agua corriente, se ajustó a un pH de 7,0 y se esterilizó. Se inoculó la cepa KC-6606 y se cultivó a 27°C durante aproximadamente 50 horas, formando un primer cultivo de siembra. Cien mililitros del primer cultivo de siembra se transfirieron a un fermentador de jarro de 20 litros, que contenía 10 litros del mismo medio estéril que antes. El cultivo se efectuó con agitación a 250 rpm, a un caudal de 10 litros por minuto, a 15 27°C, durante 4 días.

De la misma manera que en el Ejemplo 1, se trató el caldo de cultivo y los productos deseados se aislaron y purificaron. Este método dió como resultado 20 mg de KA-6606 I como base libre, 4 mg de KA-6606 II como base libre, 4 mg de KA-6606 III como base libre, y 5 mg de KA-6606 IV como base libre, todos en la forma purificada.

Ejemplo 3

25 Cuarenta miligramos del KA-6606 I obtenido en el Ejemplo 1 o 2 se disolvieron en 1 mol de una solución acuosa 4N de hidróxido sódico, y la solución se calentó durante 1 hora. La mezcla de reacción se disolvió en 100 ml de agua, se neutralizó, y se pasó a través de una columna (1 x 10 cm) de una resina intercambiadora de cationes, Amberlite CG-50 (forma NH_4^+). La columna se lavó con 100 ml de agua desionizada, y se eluyó con hidróxido amónico 1N. Las fracciones 30

1 que tenían actividad antibacteriana y mostraron resultado
positivo en una reacción de ninhidrina se recogieron y lio-
filizaron, proporcionando 23 mg de un polvo blanco de KA-
-6606 II, como base libre.

5 Ejemplo 4

Cuarenta miligramos del KA-6606 III obtenido en el
Ejemplo 1 o 2 se disolvieron en 1 ml de un hidróxido sódico
4N, y la solución se calentó durante 1 hora. La mezcla de
reacción se disolvió en 100 ml de agua desionizada, se neu-
10 tralizó y luego se pasó a través de una columna (1 x 10 cm)
de una resina intercambiadora de cationes, Amberlite CG-50
(forma NH_4^+). La columna se lavó con 100 ml de agua desio-
nizada, y se eluyó con hidróxido amónico 1N. Las fracciones
que mostraron resultado positivo en una reacción de ninhi-
15 drina, y tenían actividad antibacteriana, se recogieron y
liofilizaron, proporcionando 18 mg de un polvo blanco de
KA-6606 II, como base libre.

Ejemplo 5

20 Cuarenta miligramos del KA-6606 IV obtenido en el
Ejemplo 1 o 2 se trataron de la misma manera que en el Ejem-
plo 3. Como resultado se obtuvieron 26 mg de un polvo blan-
co de KA-6606 II, como base libre.

25

30

050478

1

REIVINDICACIONES

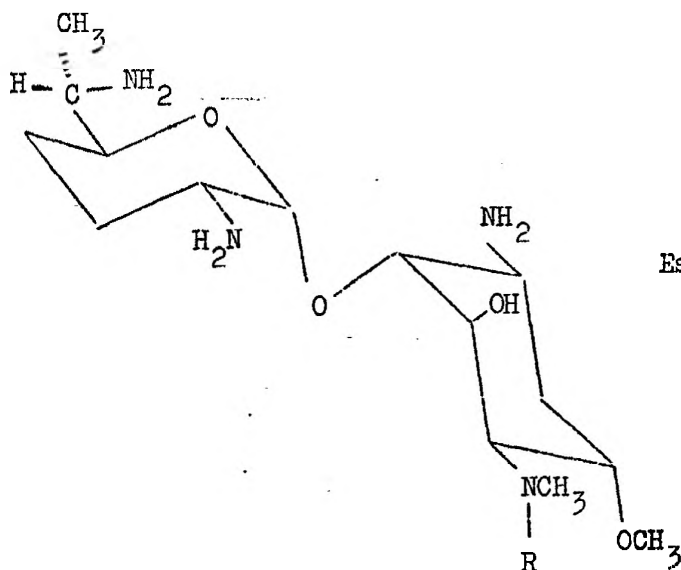
5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para obtener un antibiótico, que comprende cultivar una cepa productora del antibiótico KA-6606 de la estructura siguiente:

15



Estructura (1)

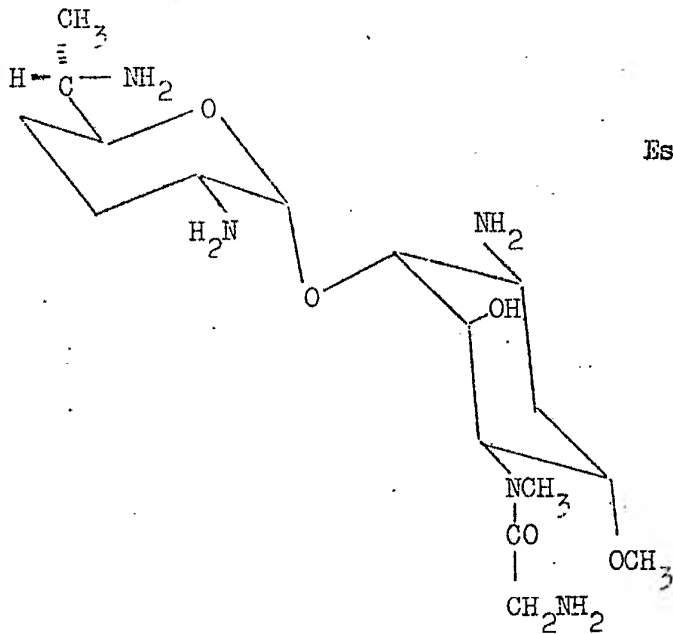
20

del género Saccharopolyspora, aislar el antibiótico KA-6606 del caldo de cultivo, y separar del antibiótico KA-6606 resultante al menos un antibiótico elegido del grupo que consta de antibiótico KA-6606 I de la estructura siguiente:

25

30

1



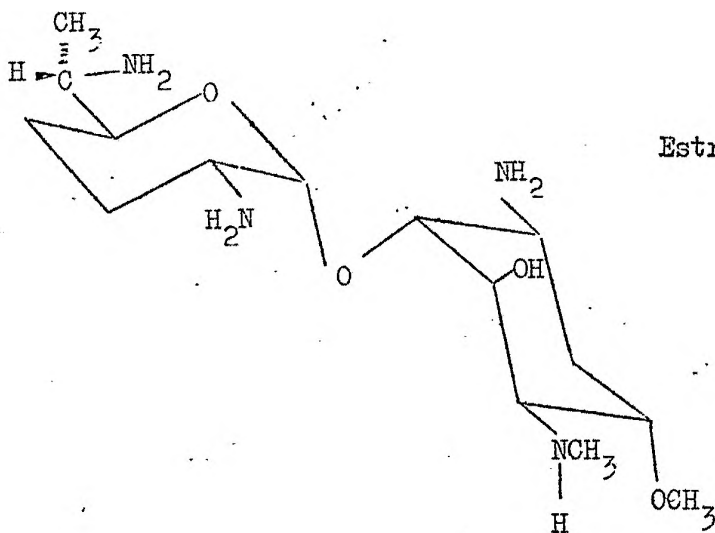
Estructura (1-a)

5

10

antibiótico KA-6606 II de la estructura siguiente:

15



Estructura (1-b)

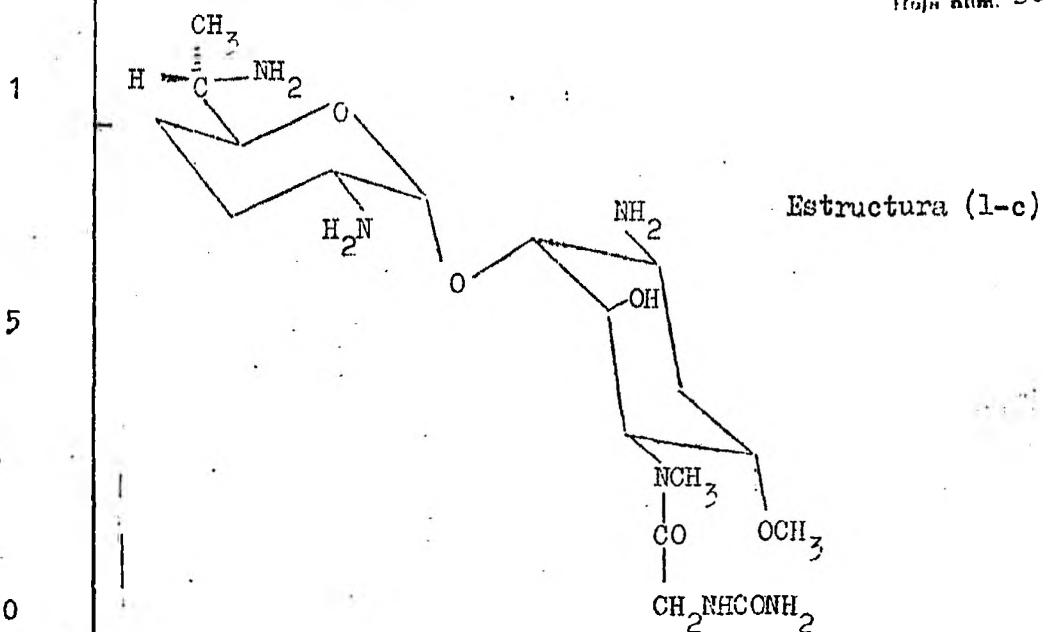
20

antibiótico KA-6606 III de la estructura siguiente:

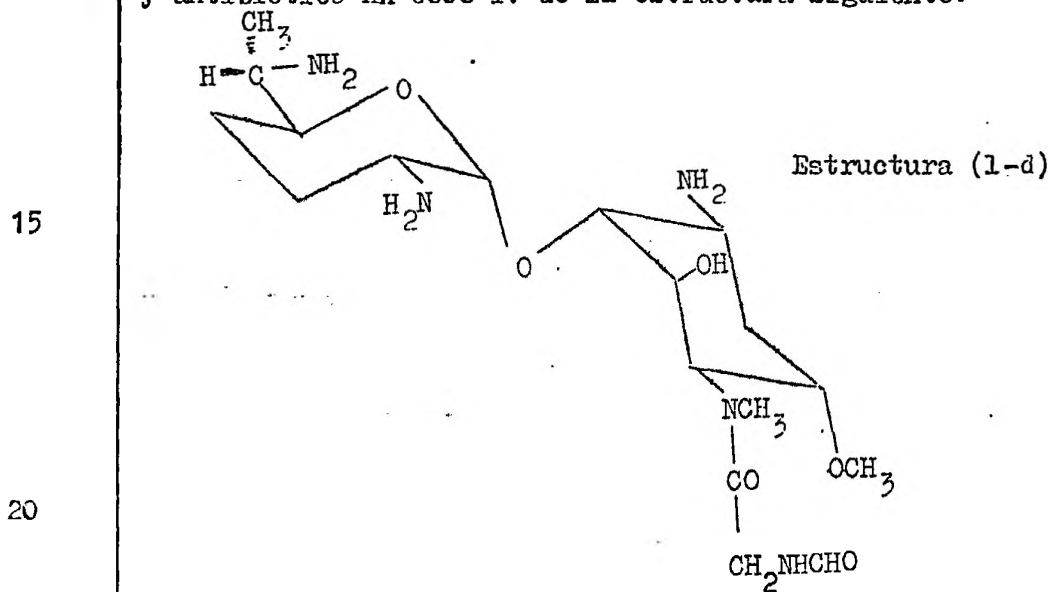
25

30

050478



y antibiótico KA-6606 IV de la estructura siguiente:



25

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que comprende además tratar el antibiótico resultante con un ácido inorgánico u orgánico aceptable en farmacia, para obtener un antibiótico en forma de una sal de adición de ácido.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, donde de la sustancia productora de antibiótico KA-6606 es Saccharopolyspora hirsuta KC-6606.

30

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, don

1

de el cultivo se efectúa bajo condiciones aerobias, a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C.

5

5ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, donde el compuesto separado elegido de los antibióticos KA-6606 I, KA-6606 III y KA-6606 IV se trata con un álcali o ácido, para convertirlo en antibiótico KA-6606 II.

10

6ª.- Un procedimiento para obtener un antibiótico. Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de TREINTA Y NUEVE hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 19. JUN 1978

15

P.A.

Oscar de Eizabury
Por Poder

20

25

30

050478

VAL

