

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

(10) ES	(11) NUMERO 468.418	(10) A1
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION	

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

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
Showa 52-35375	31 de marzo de 1.977	JAPON

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C07G	(52) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(64) TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN NUEVO ANTIBIOTICO CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE BETA-LACTAMASA.

(71) SOLICITANTE (ES)
SANRAKU-OCEAN Co., Ltd y PANLABS, Inc.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
el 1º en: Ajinomoto Building, 7, Takara-cho, 1-chome, chu-ku, Tokyo 104, Japon., el 2º en: P.O.Box 81 Fayetteville, New York 13066, EE.UU. de A.

(72) INVENTOR (ES)
Kazuhiko Okamura, Shoji Hirata, Yasushi Okumura, Yasuo Fukagawa., Tasutaka Shimauchi, Tomoyuki Ishikura, Kageaki Kouno, Joseph Lein.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.

Ya se conocen ciertos antibióticos que tienen actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasa o agentes inhibidores de  $\beta$ -lactamasa. Por ejemplo, se han registrado los siguientes: MC696-SY2-A y B aislados del caldo de cultivo de la cepa productora MC696-SY2 perteneciente al género Streptomyces (Patente USA 3.928.569: Derwent CPI 15846V), MM4550 ó MM13902 aislados de materiales de cultivo de la cepa productora MM4550 ó MM13902 que pertenece al género Streptomyces (solicitud alemana DOS 2.513.855: Derwent CPI 67721W; Solicitud alemana DOS 2.513.854: Derwent CPI 67720W), ácido clavulánico aislado de materiales de cultivo de Streptomyces clavuligerus (solicitud alemana DOS 2.517.316: Derwent CPI 72840W), y similares. Igualmente, ya ha sido registrado el antibiótico tienamicina que tiene un esqueleto químico similar a la penicilina y los derivados del mismo (Patente US 3.950.357: Derwent CPI 31696X; solicitud alemana DOS 2.652.677: Derwent CPI 40282Y; Patente belga 848.346: Derwent CPI 34505Y; Patente belga 848.349: Derwent CPI 34507: Solicitud alemana DOS 2.652.680; Derwent CPI 40283Y; solicitud alemana DOS 2.652.675; Derwent CPI 40280Y: Solicitud alemana DOS 2.652.674: Derwent CPI 40279Y; Solicitud alemana DOS 2.652.676: Derwent CPI 40281Y).

Esta invención se relaciona con un procedimiento para preparar un nuevo antibiótico y sus derivados. Más particularmente, se relaciona con un procedimiento para preparar un nuevo antibiótico definido como PS-5 y sus derivados, que tiene fuerte actividad antibiótica, actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasa y capacidad para realzar sinergísticamente la actividad antibiótica de penicilinas, cefalosporinas o similares contra los productores de  $\beta$ -lactamasa.

El primer objeto de la presente invención es pro-

porcionar un procedimiento para la preparación de la nueva sustancia antibiótica PS-5 que tiene una fuerte actividad antibiótica y actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasa.

5 El segundo objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar derivados, particularmente el derivado tritilo, de dicho antibiótico PS-5 que muestra también fuerte actividad antibiótica y actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasa.

10 Otro objeto de la invención es demostrar que el nuevo antibiótico PS-5 y el derivado tritilo del mismo tienen también la capacidad de realzar sinérgicamente la actividad antibiótica de las penicilinas, cefalosporinas o similares contra las bacterias resistentes productoras de  $\beta$ -lactamasa.

15 Otro objeto de la invención es proporcionar el procedimiento para la producción del antibiótico PS-5 mediante un método de fermentación y proporcionar un cultivo puro de un microorganismo capaz de producir dicho antibiótico.

20 Otro objeto de esta invención es proporcionar un método para la producción de los derivados del antibiótico PS-5 y más particularmente para la producción del derivado tritilo.

25 Otro objeto más de esta invención es proporcionar métodos y composiciones preventivas y terapéuticas del antibiótico PS-5 o su derivado tritilo para utilizarse en enfermedades infecciosas causadas por bacterias gram-positivas y gram-negativas, incluyendo las combinaciones sinérgicas con penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos sensibles a  $\beta$ -lactamasa.

30 Otros objetos de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción.

El antibiótico PS-5 se puede producir mediante un proceso que comprende cultivar un microorganismo productor de antibiótico PS-5 en un medio nutriente y aislar el antibiótico PS-5.

5 Microorganismos representativos de las cepas productoras de antibiótico PS-5 anteriormente mencionadas, pertenecen al género *Streptomyces*. Como ejemplo más adecuado, se describe aquí una cepa de *Streptomyces* que fue aislada de una muestra de tierra recogida cerca del Templo Eihei-ji en el distrito Fukui de la Prefectura de Fukui en Japón y que tiene el número de cepa A271.

Características taxonómicas de la cepa A271

Las características taxonómicas de la cepa *Streptomyces* A271 son las siguientes:

15 1) Características morfológicas

Ramificación de micelio aéreo esporulado: simplemente ramificado. Forma del micelio aéreo esporulado: la parte superior del micelio aéreo muestra ganchos, lazos o espirales incompletas.

20 Se considera pertenecer a la sección *Retinaculum-Apertum*. Estas formas son particularmente observadas cuando se realiza el cultivo en medio de agar de harina de avena y medio de agar de glicerina-asparagina, mientras que se observa ocasionalmente una forma recta u ondulada sobre medio de agar de extracto de levadura-extracto de malta. Forma y número de la cadena de esporas: esporas ovaladas o cilíndricas que forman una cadena de más de 10 esporas (normalmente 10 a 50).  
25 Tamaño y estructura superficial de las esporas: 0,8-1,0 x 1,0-1,8  $\mu$ , superficie lisa. No se observan ni flagelas ni esporangia. Se forman hifas en el micelio aéreo.  
30

2) Características de cultivo

Las características de cultivo de la cepa A271 se muestran en la Tabla 1, en la cual se ofrecen los resultados de la observación después de dos semanas de cultivo a 28°C, salvo cuando se indique lo contrario. La expresión del tono de color está basada principalmente en el método de H.D. Tresner y E.J. Backus' "System of color wheels for Streptomycete taxonomy" (véase Appl. Microbiol. 11, 335, 1963) y en el código de tono de colores de "Guide to Color Standard" publicado por Japan Color Institute Foundation.

Tabla 1

Medio	Crecimiento	Color del micelio aéreo	Color del micelio del sustrato	Pigmento soluble
Medio de agar de sucrosa-nitrato	abundante	amarillo naranja claro (3ea)	amarillo claro a naranja claro (3ea)	ninguno
Medio de agar de glucosa-asparaginoso	abundante	amarillo naranja pálido (3ca) a naranja claro (3ea)	amarillo claro (1½fb)-2fb)	ninguno
Medio de agar de glicerina-asparagina	abundante	"	amarillo claro a rosa algo amarillento (4gc)	ninguno
medio de agar de almidón-sal inorgánica	abundante	amarillo naranja pálido (3ca) a naranja claro (3ea)	amarillo naranja claro (3ea) a amarillo claro (2fb)	ninguno

Medio	Crecimiento	Color del micelio aéreo	Color del micelio del sustrato	Pigmento soluble
Medio de agar de tirosina	abundante	amarillo naranja pálido (3ca) a amarillo naranja claro (3ea)	amarillo naranja claro (3ea) a amarillo marrón	ninguno
Medio de agar nutriente	abundante	escasamente formado; si se forma, algo oscuro	amarillo pálido (2db)	ninguno
Medio de agar de extracto de levadura-extracto de malta	abundante	amarillo naranja pálido (3ca) a amarillo naranja claro (3ea)	amarillo naranja claro (3ea) a marrón pálido (4ie)	ninguno
Medio de agar de harina de avena	abundante	naranja pálido (3ca) a amarillo naranja claro (3ea)	amarillo claro (2fb)	ninguno

### 3) Características fisiológicas

- 1) Gama de temperatura de crecimiento: 10-40°C, óptima 20-30°C.
- 2) Licuación de gelatina (sobre medio de glucosa-peptona-gelatina): licua (cultivada a 20°C).
- 3) Hidrólisis de almidón (sobre medio de agar de almidón-sal inorgánica): hidroliza.
- 4) Coagulación y peptonización de leche desnatada: peptoniza pero no se observa coagulación.

5) Formación de pigmento melanoide: no se forma pigmento melanoide sobre medio de agar de tirosina y medio de agar de peptona-levadura-hierro y en el caldo de extracto de triptona-levadura.

5 6) Utilización de las siguientes fuentes de carbono (medio de agar de Fridham y Gottlieb):

	L-Arabinosa	+
	D-xilosa	+
	D-glucosa	+
10	D-fructosa	-
	Sucrosa	±
	Inositol	-
	L-Ramnosa	+
	Rafinosa	-
15	D-Mannitol	-

(+ : bien utilizado, ± : ligeramente utilizado, - : muy ligeramente utilizado o no utilizado en absoluto).

20 A partir de las características anteriores es evidente que la cepa A271 pertenece al género Streptomyces y que muestra características compartidas por los microorganismos pertenecientes a la sección RA, puesto que el tono de color de la superficie del micelio es amarillo o rojo, la superficie de esporas es lisa y no se forma pigmento soluble en agua de tipo melanoide.

25 Se buscaron cultivos con tales características taxonómicas en "The Actinomycetes" de Waksman vol. 2" (1961), artículos de E.B. Shirling y D. Gottlieb en International Journal of Systematic Bacteriology vol. 18, páginas 69-189 (1968), ibid., páginas 279 - 892 (1968), ibid., vol. 19, páginas 391-512 (1969), ibid., vol. 22, páginas 265-394 (1972), y Manual of determinative Bacteriology de Bergey

30

8ª edición (1974). Los cultivos similares pertenecientes a la sección RA resultaron ser Actinomyces cremeus, Actinomyces flavidovirens, Actinomyces albohelvatus, Actinomyces flavescens, Streptomyces rutgersensis, Streptomyces chryseus, Streptomyces helveticus. Como uno de los cultivos parecidos se seleccionó igualmente Streptomyces pluricolorscens, basado en sus características morfológicas, si bien pertenecía a la sección RF. Estos ocho cultivos, excepto el último, Streptomyces pluricolorscens, fueron registrados como productores de micelio aéreo de forma recta o lazos, dependiendo la variación de las condiciones de cultivo. Los cultivos tipo de las ocho especies anteriores fueron comparados con la cepa A271 de esta invención después del cultivo bajo las mismas condiciones. A partir de los resultados, la cepa A271 es evidentemente discriminada de estos cultivos con diferencias en el crecimiento, color del micelio aéreo y color del micelio de sustrato, así como con diferencias notables en la utilización de las fuentes de carbono.

En las Tablas 2, 3 y 4 se ofrecen los resultados de la comparación de la cepa A271 con los dos cultivos que más se le parecen:

Tabla 2

Comparación con los cultivos parecidos  
color del micelio aéreo.

Medio	Cepa A271	Actinomyces cremeus ISP 5147	Actinomyces flavidovirens ISP 5150
Medio de agar de sucrosa-nitrato	amarillo naranja claro (3ea)	escasamente formado	sin formar
Medio de agar de glucosa-asparagina	amarillo naranja pálido (3ca) a amarillo naranja claro (3ea)	amarillo naranja pálido (3ca)	blanco (b)

Tabla 2 (Continuación)

Medio	Cepa A271	Actinomyces cremeus ISP 5147	Actinomyces flavidovirens ISP 5150
Medio de agar de glicerina-asparagina	amarillo naranja pálido (3ca) a amarillo naranja claro (3ea)	amarillo naranja pálido (3ca)	escasamente formado; si se forma es ligeramente blanco (a)
Medio de agar de almidón-sal inorgánica	amarillo naranja pálido (3ca) a amarillo naranja claro (3ea)	amarillo naranja pálido (3ca)	finamente formado, blanco (a) a amarillo pálido (2db)
Medio de agar nutriente	escasamente formado, se forma, algo oscuro	blanco (a) a amarillo naranja pálido (3ca)	blanco
Medio de agar de levadura-extracto de malta	amarillo naranja pálido (3ca) a amarillo naranja claro (3ea)	amarillo pálido (2db)	blanco (b) a verde amarillento pálido (1cb)
Medio de agar de harina de avena	amarillo naranja pálido (3ca) a amarillo naranja claro (3ea)	blanco (b) a amarillo naranja pálido (3ca)	blanco (b) a verde amarillento pálido (1bd)

Tabla 3

Comparación con los cultivos parecidos

Color del micelio del sustrato

Medio	Cepa A271	Actinomyces cremeus ISP 5147	Actinomyces flavidovirens ISP 5150
Medio de agar de sucrosa-nitrato	amarillo claro (2fb) a amarillo naranja claro	pobre crecimiento, incoloro a blanco (b)	pobre crecimiento, incoloro a blanco (a)

Tabla 3 (Continuación)  
Comparación con los cultivos parecidos

Color del micelio del sustrato

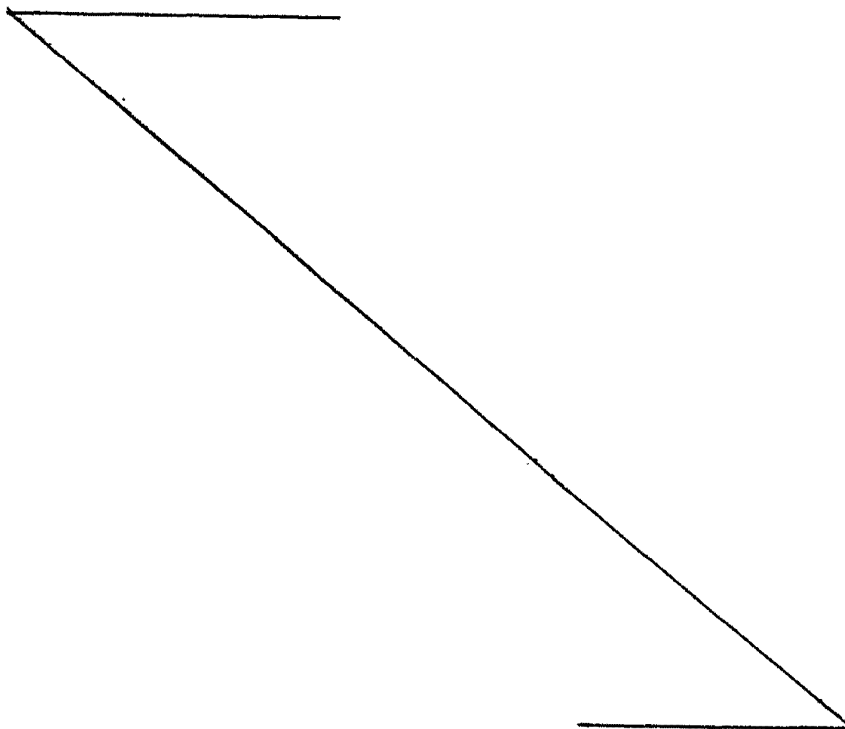
Medio	Cepa A271	<u>Actinomyces cremeus ISP 5147</u>	<u>Actinomyces Flavidovirens ISP 5150</u>
Medio de agar de glucosa-asparagina	amarillo claro (1½fb - 2fb)	amarillo naranja claro (3ea)	amarillo pálido (2db)
Medio de agar de glicerina-asparagina	amarillo claro (2fb) a rosa algo amarillento	amarillo naranja pálido (3ea)	amarillo grisáceo (3ec)
Medio de agar de almidón-sal inorgánica	amarillo naranja claro (3ea) a amarillo claro (2fb)	moderado, rosa amarillento (4ea)	amarillo claro (2fb)
Medio de agar de tirosina	amarillo naranja claro (3ea) a amarillo parduzco	marrón pálido (4ie)	amarillo grisáceo (3ec)
Medio de agar nutriente	amarillo pálido (2db)	amarillo naranja claro (3ea)	amarillo pálido (2db)
Medio de agar de extracto de levadura-extracto de malta	amarillo naranja pálido (3ea) a marrón pálido (4ie)	amarillo naranja pálido (3ea) a amarillo oscuro	amarillo mate
Medio de agar de harina de avena	amarillo claro (2fb)	algo, rosa amarillento (4gc)	amarillo pálido (2db) a amarillo naranja pálido (3ca)

Tabla 4

Comparación con los cultivos parecidos

Utilización de fuentes de carbono

<u>Fuente carbono</u>	<u>Cepa A271</u>	<u>Actinomyces cremeus ISP 5157</u>	<u>Actinomyces flavidovirens ISP 5150</u>
L-arabinosa	+	+	+
D-xilosa	+	+	+
D-glucosa	+	+	+
D-Fructosa	-	+	+
Sucrosa	+	-	-
Inositol	-	-	-
L-Ramnososa	+	-	+
Rafinosa	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-



De los resultados mostrados en las tablas anteriores, se sacaron las siguientes consideraciones: en relación con el color del micelio aéreo: Actinomyces flavidovirens es generalmente blanco pero cuando es amarillo, es amarillo  
5 verdososo, siendo claramente diferente de la cepa A271 de esta invención, y Actinomyces cremeus muestra generalmente un tono rojizo más débil del color amarillo naranja pálido que el tono de la cepa A271, siendo claramente discriminado de la cepa A271.

10 En relación con el color del micelio de sustrato, Actinomyces flavidovirens muestra un color amarillo pálido y Actinomyces cremeus muestra un color amarillo naranja claro en muchos casos, mientras que la cepa A271 muestra generalmente un color amarillo claro. Por otra parte, la comparación detallada de los resultados experimentales obtenidos en los diversos  
15 medios, demuestra definitivamente que la cepa A271 es diferente de los otros dos cultivos. La cepa A271 difiere de Actinomyces cremeus respecto a la utilización de D-fructosa y L-ramnosa y de Actinomyces flavidovirens en relación con la  
20 utilización de D-fructosa e inositol.

En consecuencia, la cepa A271 de esta invención es claramente diferente de los dos cultivos conocidos que más se le parecen.

Por tanto, la cepa A271 es diferente de todas las  
25 especies Streptomyces conocidas y se reconoce como una nueva especie, designada como Streptomyces sp. A271. Este cultivo ha sido depositado en Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology en donde se le ha asignado el número de cultivo FERM-P No. 3984. Una muestra  
30 del Streptomyces sp. A271 fue depositada también en ATCC en donde se le asignó el número 31358.

En esta invención, no solo se puede utilizar la cepa A271 sino también sus mutantes naturales y artificiales, los cuales pueden inducirse mediante tratamientos químicos o físicos.

5                    Los productores del antibiótico PS-5 se pueden seleccionar entre una amplia gama de microorganismos que no están limitados a un género particular. La selección de los microorganismos productores de PS-5 se puede efectuar siguiendo cualquier método conocido ya por los expertos en la materia.

10 Los filtrados de caldo de cultivo de microorganismos, aislados de la tierra, se analizan utilizando placa de agar de bio ensayo inoculada con un microorganismo susceptible a  $\beta$ -lactama y otra placa de agar de bio ensayo que contiene  $\beta$ -lactamasa e inoculada con el mismo organismo. Los microorganismos que

15 proporcionan filtrados de caldo que muestran zonas inhibitoras más pequeñas en la última placa de bio ensayo que en la primera placa de bio ensayo, se eligen para continuar el trabajo. A continuación, los componentes activos del caldo de cultivo de los microorganismos seleccionados por el método anterior, son adsorbidos sobre carbón activo y a continuación eluidos. Los

20 eluidos concentrados se desarrollan mediante cromatografía de papel o cromatografía de capa fina, efectuándose a continuación una bioautografía con un microorganismo susceptible a  $\beta$ -lactama como organismo de ensayo. El método de evaluación se explica de forma más completa en el siguiente ejemplo. La placa de

25 bio ensayo Comamonas, más adelante descrita, se utiliza como placa de agar de bio ensayo inoculada con el organismo de ensayo susceptible a  $\beta$ -lactama. La placa de bio ensayo Comamonas CV y la placa de bio ensayo Comamonas CM se preparan

30 añadiendo a la anterior placa de bio ensayo Comamonas la

(b) -lactamasa producida por Proteus vulgaris P-5 y Citrobacter freundii E-9 respectivamente.

5 En las anteriores placas de bio ensayo se colocan discos de pulpa de 8 mm de diámetro incorporados con los filtrados de caldo de cultivo de los microorganismos aislados de la tierra y las placas se incuban a 35°C durante 20 horas.

10 Después de la incubación, se eligen los microorganismos cuyo filtrado de caldo proporciona una zona inhibidora sobre la placa de bio ensayo Comamonas y una zona inhibidora más pequeña sobre la placa de bio ensayo Comamonas CV o placa de bio ensayo Comamonas CM.

15 A los filtrados de caldo de dichos microorganismos, se añade una cantidad de 2% p/v de carbón activado ("Tokusei Shirasagi", Takeda Chemical Industries, Ltd.) y después de agitar durante 15 minutos se recoge el material insoluble por centrifugado. El material insoluble se lava con agua destilada del mismo volumen que el filtrado de caldo utilizado y se recoge de nuevo por centrifugación. El material insoluble lavado se eluye añadiendo acetona acuosa al 50% v/v  
20 de la mitad de volumen del filtrado de caldo utilizado y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de centrifugar, el líquido sobrenadante se evapora a 30-35°C empleando un evaporador rotativo para obtener una solución 20 veces concentrada en comparación con el filtrado de caldo usado.  
25 La solución concentrada se somete a cromatografía de papel descendente con papel de filtro (Toyo Filter Paper, Toyo Roshi Kaisha Ltd.) mediante desarrollo durante 16 horas con 80% acetónitrilo/tris-EDTA como disolvente (compuesto de 120 ml de acetónitrilo, 80 ml de tampón de tris-(hidroximetil)-aminometano/HCl pH 7,5 y 1 ml de solución acuosa de la sal sódica de  
30

ácido etilendiamina tetraacético). A continuación se efectúa una bioautografía con Comamonas terrigena B-996 como organismo de ensayo.

5 Los microorganismos aislados de la tierra, cuyo producto activo biológico proporciona una zona inhibidora en la misma distancia de emigración (o idéntico valor Rf) que el antibiótico PS-5, se eligen como candidatos para la producción del antibiótico PS-5. Los microorganismos candidatos elegidos son examinados adicionalmente para confirmar la capacidad productora de antibiótico PS-5 mediante estudios adicionales de cromatografía de papel y de capa delgada.

10 Usando los métodos antes mencionados, cualquier persona experta en la materia podrá seleccionar otros productores de antibiótico PS-5 además de la cepa Streptomyces sp. A271 antes descrita.

15 De acuerdo con una modalidad de esta invención, el antibiótico PS-5 se puede obtener por inoculación de esporas del micelio de una cepa microbial capaz de producir dicho antibiótico, tal como Streptomyces sp. A271, en un medio nutriente, efectuando a continuación el cultivo de la misma aerobica-  
20 mente.

25 Como nutrientes se pueden utilizar muchos tipos de nutrientes normalmente empleados por Streptomycetes, por ejemplo, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y similares. Por ejemplo, como nutriente se pueden emplear las fuentes de carbono de carbohidratos tales como glucosa, glicerina, maltosa, sucrosa, molasas, dextrina, almidón o similares y de aceites o grasas tales como aceite de soja, aceite de cacahuete, manteca o similares; las fuentes de nitrógeno  
30 pueden ser, por ejemplo, aquellas tales como peptona, extracto

de carne, harina de soja, aceite de algodón, levadura seca, licor de maceración de maíz, extracto de levadura, caseína de leche desnatada, nitrato sódico, nitrato amónico, sulfato amónico o similares; y como sales inorgánicas se pueden emplear fosfato dipotásico, cloruro sódico, carbonato cálcico, sulfato de magnesio o similares; también se pueden emplear trazas metálicas, por ejemplo, cobalto, manganeso y similares, si es necesario. En adición, se pueden emplear todos los nutrientes que puedan ser utilizados por el organismo para producir el antibiótico PS-5. Para evitar el espumado durante la esterilización por calentamiento y durante la fermentación, pueden añadirse agentes antiespumantes tales como aceite de silicona, aceite vegetal y similares.

La proporción de nutrientes en la formulación no viene limitada por la descripción anterior, pero puede variar-se dentro de una amplia gama. La formulación y composición de nutrientes más adecuadas se puede determinar fácilmente mediante simples experimentos a pequeña escala, realizados por cualquier persona experta en la materia.

El medio se puede esterilizar antes del cultivo. El pH del medio se ajusta preferiblemente en la gama de 4 a 9, con preferencia en la gama de 6 a 8, antes o después de la esterilización. El cultivo de la cepa productora del antibiótico PS-5 se puede realizar esencialmente por un método similar al que generalmente ha sido empleado para la producción de antibióticos mediante Streptomycetes. En general es preferible el cultivo bajo condiciones aeróbicas, es decir cultivo bajo agitación y/o aireación.

Aunque se puede utilizar cualquier método de cultivo elegido entre los cultivos estacionarios, agitados y sumergi-

dos, es más preferible emplear el cultivo sumergido. La temperatura de fermentación a emplear no está particularmente limitada pero en general se elige dentro de la gama en la cual el crecimiento del productor de antibiótico PS-5 no es sustancialmente inhibido, pudiéndose obtener el antibiótico PS-5 aunque la temperatura de fermentación se puede variar según el tipo de cepa productora usada, en general la temperatura adecuada será del orden de 20 a 40°C, con preferencia 25 a 35°C.

El pH del caldo de cultivo se puede ajustar durante la fermentación, en la gama de 4 a 9, preferiblemente 6 a 8.

En la fermentación a gran escala, es preferible cultivar un cultivo de semillas adecuado e inocular entonces el medio nutriente para el cultivo sumergido con dicho cultivo de semillas.

La fermentación se puede continuar normalmente hasta que se acumula una cantidad suficiente del antibiótico PS-5. El tiempo de fermentación es normalmente del orden de 30 a 90 horas, pero varía con la composición del medio, temperatura de fermentación, cepa productora usada y factores análogos. Las condiciones de fermentación óptimas a utilizar se pueden determinar fácilmente después de pequeños experimentos realizados por cualquier persona experta en la materia. La cantidad acumulada del antibiótico PS-5 en el caldo de fermentación se puede determinar por el método de bio ensayo y por bio autografía, que más adelante se describirán.

Puesto que el antibiótico PS-5 acumulado en los materiales fermentados es soluble en agua y está situado principalmente fuera del micelio, es preferible separar el micelio después de la fermentación mediante cualquier proceso de separación conocido, tal como filtración, centrifugado, extracción o

similares, y recuperar el antibiótico del filtrado, líquido sobrenadante, extracto o similar.

La recuperación del antibiótico se puede realizar por diversos procesos normalmente ya conocidos. En particular, un método preferido para la recuperación del antibiótico consiste en el método que frecuentemente se utiliza para la recuperación de antibióticos de tipo ácido carboxílico. Por ejemplo, los siguientes procedimientos pueden emplearse independientemente o en combinación o repetidamente para la recuperación y aislamiento del antibiótico PS-5: (a) extracción a bajo pH con un disolvente tal como acetato de etilo, n-butanol o similar, y re-extracción de la capa disolvente en una capa acuosa a pH mayor; (b) extracción a pH neutro con disolventes tales como cloruro de metileno, cloroformo y análogos, en presencia de una sal de amonio cuaternario lipofílica tal como cloruro de benzalconio, hidrogenosulfato de tetra-n-butilamonio o similares, o un compuesto corona tal como los éteres corona NISSO tales como dicitclohexil-18-corona-6 y 15 - corona - 5 (Nippon Soda Co., Ltd.) y re-extracción a partir de la capa disolvente en una capa acuosa neutra que contiene yoduro sódico, yoduro potásico y similares; (c) adsorción sobre carbón activo o sobre resinas de estireno/divinilbenceno de alta porosidad, tales como Amberlite XAD (Rohm & Haas Co.), Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) o similares y elución con metanol acuoso, acetona acuosa o similares; (d) adsorción y elución con resina intercambiadora de iones tales como Dowex 1-X2 (Dow Chemical Co.) QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia Fine Chemicals AB) o similares; (e) filtración con gel con Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals AB), Bio-Gel P-2 (Bio-Rad Laboratories), Bio-Beads S-X3 (Bio-Rad Laboratories) o similares;

(f) cromatografía en columna o de capa fina con celulosa, Avicel SF (American Viscose Corp.), DEAE-Cellulosa Whatman DE-32 (Whatman Ltd.). DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia Fine Chemicals AB), gel de sílice, alúmina o similares; y (g) precipitación forzada añadiendo disolvente tal como acetona, etc.

El comportamiento del antibiótico PS-5 en los procesos de recuperación y aislamiento se puede reconocer determinando el antibiótico PS-5 mediante un método de bio ensayo y bio autografía que más adelante se describen. Del modo anteriormente indicado, se puede obtener el antibiótico PS-5 que muestra las características descritas a continuación.

#### Propiedades físico-químicas del antibiótico PS-5

##### (1) Solubilidad

El antibiótico PS-5 es soluble en agua a pH 6-9. Más específicamente, este antibiótico es soluble no solo en agua a pH 7 sino también en un medio acuoso ligeramente ácido ajustado a pH 6 o superior a 6 añadiendo, por ejemplo, ácido clorhídrico, etc., y en un medio acuoso debilmente alcalino ajustado a un pH inferior a 9 añadiendo, por ejemplo, bicarbonato sódico, hidróxido sódico, etc. Este antibiótico es sustancialmente insoluble en acetato de etilo y benceno, a pH superior a 4.

##### (2) Cromatografía de capa fina (TLC)

El antibiótico PS-5 (sal sódica) proporciona los valores Rf cuando se ensaya con las siguientes placas y disolventes de TLC. Las proporciones de disolventes de la mezcla de disolventes utilizada, se expresan como una proporción de volumen a volumen, a menos que se diga lo contrario.

(a) Placa de capa fina de celulosa Avicel <sup>®</sup> SF  
(Funakoshi Pharmaceutical Co., Ltd)

n-butanol/etanol/agua (7/7/6) Rf=0,94

i-propanol/agua (7/3) Rf=0,96

(b) Placas de gel de sílice pre-revestidas 60 F<sub>254</sub> (E. Merck)

Etanol/agua (7/3) Rf =0,82

5 n-propanol/agua (7/3) Rf =0,77

(3) Cromatografía de papel

El antibiótico PS-5 (sal sódica) proporciona los siguientes valores Rf, cuando se utiliza el papel de filtro Toyo No. 50 (Toyo Roshi Kaisha Ltd.) y la cromatografía de papel descendente se desarrolla con los siguientes disolventes:

10

n-propanol/agua (7/3) Rf=0,68

n-propanol/i-propanol/agua (7/7/6) Rf=0,70

Acetonitrilo/agua (8/2) Rf=0,36

Acetonitrilo/Tris/EDTA (Nota 1) Rf=0,34

15

Etanol/agua (7/3) Rf=0,63

Nota 1: Disolvente mixto compuesto de 120 ml de acetonitrilo, 30 ml de tampón de pH 7,5 de tris-(hidroximetil)-aminometano 1/10 M-ácido clorhídrico y 1 ml de sal sódica de ácido etilendiamina tetraacético 1/10 M, pH 7,5.

20

(4) Electroforesis de papel a elevada tensión

Se observa el siguiente comportamiento cuando el antibiótico PS-5 (sal sódica) se somete a electroforesis sobre papel de filtro Toyo del No. 50 (Toyo Roshi Kaisha Ltd.) usando un aparato de electroforesis de papel de elevada tensión (Savant Instruments Inc., High Voltage Power Supply HV 3000A, Flat Plate Electrophoresis Chamber FP18A): al menos 5 mm, normalmente 10-40 mm, de emigración al ánodo mediante carga durante 30 minutos en un gradiente de potencial de 42 voltios por cm en tampón de pH 8,6 compuesto de 3.000 ml de agua, 3,3 g de barbital y 25,5 g de barbital sódico.

25

30

(5) Acidez

El antibiótico PS-5 es un ácido monobásico que tiene un grupo ácido carboxílico en la molécula.

(6) Espectro de absorción UV

5 El máximo de absorción UV característico del antibiótico PS-5 (sal sódica) es como sigue:

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} = 301 \text{ nm}$$

(7) Espectro de absorción IR

10 Los máximos de absorción IR característicos del antibiótico PS-5 (sal sódica) medidos por el método de la tableta de KBr, son como sigue:

aproximadamente 1750 cm <sup>-1</sup>	(-CO en anillo β-lactama)
aproximadamente 1650 cm <sup>-1</sup>	(-CO- de amida)
aproximadamente 1640- 1540 cm <sup>-1</sup>	(-COO <sup>⊖</sup> )

15 (8) Espectro de RMN protónica

El antibiótico PS-5 (sal sódica) proporciona las siguientes señales características en el espectro RMN protónico a 100 Mhz, medido en D<sub>2</sub>O:

- 20 (i) un triplete centrado aproximadamente en 1,06 ppm con constantes de acoplamiento de aproximadamente 7,5HZ (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-);
- (ii) un multiplete en aproximadamente 1,72 - 2,00 ppm (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-);
- (iii) un singlete agudo en aproximadamente 2,05 ppm (CH<sub>3</sub>-CO-);
- (iv) un multiplete en aproximadamente 2,88-3,58 ppm (CH<sub>2</sub>, -CH-);
- (v) un multiplete en aproximadamente 3,92 - 4,20 ppm  $\begin{matrix} \text{N} \\ | \\ \text{-CH-} \end{matrix}$ .

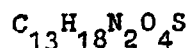
25 (9) Rotación específica

$$[\alpha]_D^{22} + 1,23 \text{ (C, 1,59, 0,01M, tampón fosfato sódico a pH 8)}$$

(10) Peso molecular y fórmula molecular

El peso molecular es de 298 aproximadamente (calculado a partir de los resultados de la espectrometría de masa de alta resolución para el éster metílico del antibiótico PS-5).

5 La fórmula molecular es:



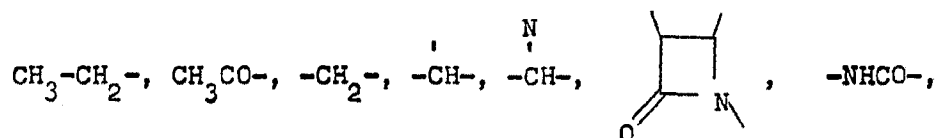
(11) Reacción de color

Reacción al reactivo Ehrlich: positiva

Reacción a yodo-ácido cloroplatínico: positiva

10 Reacción con ninhidrina: negativa.

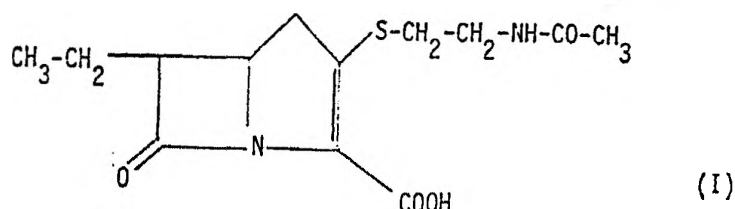
Mediante las anteriores propiedades físico-químicas, se demuestra definitivamente que los grupos



15 y COO<sup>⊖</sup> están presentes en una molécula del antibiótico PS-5 (sal sódica).

El análisis elemental del éster de tritilo del antibiótico PS-5 (ejemplo 10) revela la presencia de azufre. Los datos del máximo y mínimo de absorción UV, así como su relación de absorbancia y coeficiente de extinción, ofrecen un soporte en relación con la presencia del esqueleto tienamicina en la molécula. Esto se confirma por el hecho de que el máximo de absorción UV cambia de 301 a 315 nm por esterificación de la mitad carboxilo (16<sup>a</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy, Chicago, Oct. 29, 1976).

25 Tomando como base las evidencias anteriores, se cree que el antibiótico PS-5 tiene la siguiente estructura molecular:



5 Esto viene apoyado por las evidencias adicionales de que, como se describe en el ejemplo 9, el antibiótico PS-5 proporciona 13 señales en el espectro <sup>13</sup>C-NMR y sus cambios químicos son consistentes con la estructura anterior en comparación con los datos obtenidos para tienamicina.

10 Aunque el antibiótico PS-5 aparece como inestable cuando el aislamiento se lleva a cabo, por ejemplo, a temperatura ambiente, el mismo es claramente estable a baja temperatura, por ejemplo, inferior a 0°C, particularmente inferior a -10°C. El antibiótico es evidentemente estable en solución acuosa a un pH próximo al neutro o debilmente alcalino. Por lo  
15 menos el 50% y normalmente más del 70% de la actividad antibiótica del antibiótico PS-5 permanece después de como mínimo 15 minutos de calentamiento a 60°C en una solución acuosa de un pH comprendido entre un valor próximo a la neutralidad y un valor debilmente alcalino por debajo de pH 9.

#### Propiedades biológicas del antibiótico PS-5

##### 20 (1) Espectro del antibiótico

El antibiótico PS-5 de esta invención, que tiene una actividad antibiótica de amplio espectro, muestra una actividad muy fuerte contra varias bacterias, por ejemplo, bacterias gram-positivas pertenecientes a géneros tales como

Staphylococcus, Diplococcus, Streptococcus, Sarcina, Bacillus y similares, y bacterias gram-negativas pertenecientes a géneros tales como Alcaligenes, Comamonas, y similares. El antibiótico PS-5 de esta invención muestra también buena actividad  
5  
contra bacterias gram-negativas pertenecientes a géneros tales como Alcaligenes, Comamonas, y similares. El antibiótico PS-5 muestra una fuerte actividad contra bacterias gram-negativas que son resistentes a los antibióticos que tienen una estructura de anillo  $\beta$ -lactama, por ejemplo, aquellas bacterias  
10 pertenecientes a géneros tales como Citrobacter, Proteus, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, y similares.

(2) Aumento de la actividad antibiótica de otros antibióticos contra bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa

El antibiótico PS-5 de esta invención tiene la capacidad de aumentar la actividad antibiótica de otros antibióticos, especialmente de antibióticos de  $\beta$ -lactama tales como penicilinas y cefalosporinas, contra bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa tales como Citrobacter freundii, Proteus vulgaris,  
15 Enterobacter aerogenes, Serratia marcescens, y similares. El modelo de actividad es sinérgico en la mayoría de los casos.  
20

(3) Actividad in vivo

El antibiótico PS-5 cuando se administra a ratones infectados con bacterias gram-positivas patogénicas, muestra un notable efecto terapéutico.

(4) Toxicidad

El antibiótico PS-5 no provoca muerte alguna en los animales de ensayo cuando se administra intraperitonealmente a ratones en una dosis de 500 mg/kg.

Derivados del antibiótico PS-5

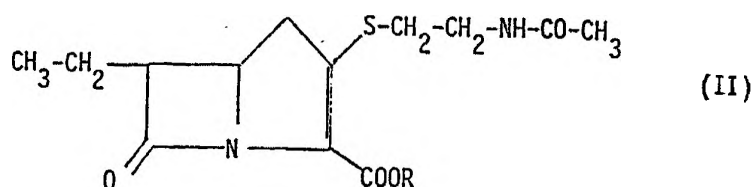
Puesto que el antibiótico PS-5 es algo lábil como  
30

5 anteriormente se ha descrito, los procesos de recuperación y  
aislamiento pueden efectuarse con gran cuidado. Puesto que el  
antibiótico PS-5 es en general más estable en forma de sal que  
en estado del ácido libre, se prefiere la forma de sal cuando  
se utiliza para uso farmacéutico y cuando se emplea como mate-  
10 rial intermedio para sintetizar los derivados y durante el  
proceso de aislamiento. La forma de sal anteriormente descrita  
incluye, por ejemplo, las siguientes: sales de metal alcalino,  
tales como sal sódica, sal potásica, sal de litio o similares;  
sales de metales alcalinotérreos, tales como sal de calcio,  
15 sal de magnesio o similares; otras sales metálicas tales como  
sal de aluminio o similares; sal amónica; sales con aminas pri-  
marias, secundarias o terciarias, tales como monoetilamina,  
dimetilamina, trietilamina, monoetanolamina, dietanolamina o  
similares; y sales con bases orgánicas tales como benzatina,  
procaína o similares. Sales adecuadas son las sales farmaceuti-  
camente aceptables, es decir sales con cationes que no afectan  
de modo desfavorable a las propiedades farmacológicas y toxi-  
20 cológicas del ácido libre. Sales particularmente adecuadas  
son las sales de metal alcalino tales como las sales sódicas,  
potásicas y similares.

25 Como anteriormente se ha descrito, el antibiótico  
PS-5 de esta invención es un ácido monobásico que tiene un  
grupo carboxílico en la molécula. Por tanto, es evidente que  
se pueden derivar diversos ésteres del antibiótico con varios  
alcoholes, mercaptanes o sus derivados para producir ésteres,  
de la misma manera que aquellos de los antibióticos conocidos  
ácido clavulánico o tienamicina, por ejemplo. Por consiguiente,  
la invención cubre también estos ésteres.

30 De acuerdo con esta invención, un éster adecuado del

antibiótico PS-5 es un éster que tiene la siguiente fórmula general:



5 en la que R es un grupo alquilo inferior o un grupo trifenil-  
metilo. En la fórmula anterior (II), el grupo alquilo inferior  
representa un grupo de cadena recta o ramificada, en particular,  
un grupo alquilo que tiene menos de 6 átomos de carbono y más  
particularmente un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de  
10 carbono. Como ejemplos se mencionan los grupos metilo, etilo,  
n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, n-pentilo, iso-  
pentilo, n-hexilo y similares.

De acuerdo con esta invención, los ésteres de fór-  
mula (II) se pueden producir haciendo reaccionar el antibiótico  
PS-5 de fórmula (I) o sus sales, con los compuestos de fórmula  
15 general (III):



en la que R se define como anteriormente e Y es un átomo o  
grupo que puede ser disociado, o con diazoalcanos inferiores.

20 En relación con los átomos o grupos Y de la fórmula  
general (III), pueden emplearse cualquier tipo de átomos o gru-  
pos que pueden disociarse cuando se ponen en contacto con el  
grupo carboxilo del antibiótico PS-5, por ejemplo, átomos de

halógeno, tales como cloro, bromo o yodo, grupos sulfoniloxi; grupos carboniloxi reactivos tales como  $-O-CO-CF_3$ ; y similares. Los átomos de halógeno se prefieren particularmente.

5 Ejemplos representativos de compuestos de dicha fórmula general (III) son los siguientes:  
Alcohol metílico, yoduro de metilo, sulfato de dimetilo, metilmercaptán, etanol, bromuro de etilo, yoduro de etilo, etilmercaptán, cloruro de n-propilo, yoduro de n-propilo, alcohol propílico, alcohol isopropílico, bromuro de isopropilo, alcohol  
10 n-butílico, bromuro de n-butilo, yoduro de n-butilo, alcohol n-pentílico, cloruro de n-pentilo, bromuro de n-pentilo, yoduro de n-pentilo, alcohol n-hexílico, bromuro de n-hexilo, yoduro de n-hexilo, alcohol tritílico, tritilmercaptán, cloruro de tritilo, bromuro de tritilo y similares.

15 Uno de los ejemplos representativos de los diazoalcanos inferiores adecuados para producir los ésteres del antibiótico PS-5, es el diazometano.

La reacción del antibiótico PS-5 con los compuestos de fórmula general (III) o con los diazoalcanos inferiores,  
20 se puede efectuar por métodos conocidos para la esterificación. Por ejemplo, la reacción del antibiótico PS-5 con los compuestos de fórmula general (III) o con los diazoalcanos inferiores, se efectúa preferiblemente en un medio líquido inerte, si bien puede realizarse también en ausencia de dicho medio. El medio  
25 inerte utilizable es, por ejemplo, seleccionado entre:

(a) hidrocarburos tales como benceno, tolueno, n-hexano, ciclohexano o similares, (b) halo-hidrocarburos tales como cloroformo, cloruro de metileno o similares, (c) amidas tales como dimetilformamida, hexametilfosfotriamida o similares, (d) dimetil  
30 sulfóxido, (e) éteres tales como éter dietílico, éter diisopro-

pílico, éter di-n-butílico, tetrahidrofurano, dioxano y similares, (f) ésteres tales como acetato de etilo, acetato de n-butilo o similares y (g) cetonas tales como acetona, metil-etilcetona o similares. Estos disolventes se pueden emplear por sí solos o en mezcla de dos o más de los mismos.

5

La temperatura de reacción no es crítica y se puede variar ampliamente según el tipo de compuesto de fórmula general (III), tipo de diazoalcano inferior, tipo de medio líquido o similares a utilizar. La temperatura de reacción se puede elegir entre la gama en la cual el antibiótico PS-5 no se descompone notablemente pero, en general, una temperatura adecuada es inferior a 60°C, con preferencia del orden de 0 a 40°C y más preferiblemente del orden de 5°C a la temperatura ambiente. En la realización de dicha reacción, puede añadirse, si es necesario, un estimulante de la reacción tal como trimetilamina, trietilamina, piridina, dicitclohexilcarbodiimida o similares. Bajo estas condiciones, la reacción se puede terminar en el espacio de 1 a 24 horas, normalmente 3-12 horas.

10

15

Según una modalidad preferida de la invención, el antibiótico PS-5 empleado para la reacción con el derivado reactivo de fórmula III en donde R es trifenilmetilo, no es necesariamente una preparación purificada aislada. Incluso el material cultivado o el caldo filtrado después de la separación del micelio del material cultivado, se puede utilizar para la reacción, así como la preparación en bruto del antibiótico PS-5 que ha sido parcialmente purificado mediante los procesos de recuperación y aislamiento anteriormente descritos. Ejemplos de preparados parcialmente purificados son: (a) un eluado concentrado de carbón activado con el cual ha sido tratado el caldo filtrado; (b) un eluado concentrado a partir de una resina de

20

25

30

estireno/divinilbenceno tal como Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) a la cual se ha sometido el caldo filtrado; (c) un concentrado de salificado con carbón activo de un eluado obtenido con un gradiente de concentración de cloruro sódico en tampón fosfato a partir de una resina intercambiadora de iones tal como, por ejemplo, QAE-Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals) sobre la cual se ha adsorbido el citado eluado concentrado de Diaion HP-20; (d) un extracto concentrado de cloruro de metileno en presencia de cloruro de benzalconio; (e) un extracto concentrado con cloroformo en presencia de compuestos de corona; y (f) un extracto de butanol concentrado a pH 3,5 a baja temperatura.

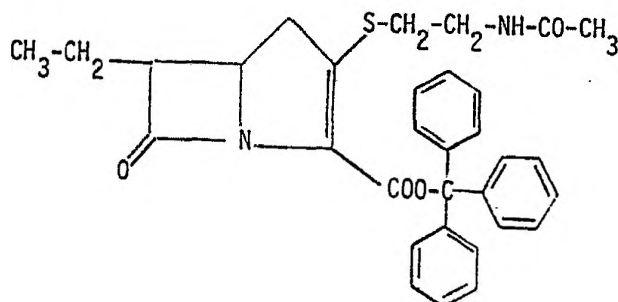
El éster de tritilo del antibiótico PS-5 así formado se puede aislar de la mezcla de reacción y purificarse por diversos métodos conocidos. Por ejemplo, y una vez terminada la reacción, la mezcla de reacción se vierte primeramente en un medio acuoso para separar las impurezas acuosas, tales como subproductos y similares. Es preferible utilizar un tampón neutro como medio acuoso para mantener el pH cerca de la neutralidad. El éster de tritilo del antibiótico PS-5 de esta mezcla se extrae entonces con un disolvente orgánico menos polar no sustancialmente miscible con agua, tal como acetato de etilo, benceno, cloroformo o similares. Durante la etapa de extracción, se puede añadir una sal tal como cloruro sódico, sulfato amónico y similares para realzar la eficacia de la extracción. Después de secar el extracto orgánico sobre sulfato sódico anhidro, el éster de tritilo se puede aislar de la capa disolvente por métodos conocidos, tales como, por ejemplo, filtración con gel utilizando Bio-Beads S-X3 (Bio-Rad Laboratories), Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals AB), y simi-

lares; o cromatografía de adsorción empleando un vehículo tal como gel de sílice, alúmina, tierra de batán (Floridin Co.) y similares, que pueden utilizarse en determinadas combinaciones adecuadas y utilizarse repetidamente, si ello es necesario.

5 El éster de tritilo se puede purificar adicionalmente por cristalización en un disolvente o mezcla de disolventes, tales como benceno, tolueno, sileno, acetato de etilo, éter dietílico, cloruro de metileno, cloroformo, hexano, éter de petróleo (con una gama de ebullición de 30 a 60°C) y similares.

10

Entre los ésteres de fórmula general (II) que pueden producirse por los procesos anteriores, el éster de tritilo del antibiótico PS-5, de fórmula (II-a)



(II-a)

15 se caracteriza como uno de los ésteres de mayor utilidad, por las siguientes propiedades: es más estable en comparación con el antibiótico PS-5 de fórmula (I) de modo que el aislamiento es más fácil y se preserva una fuerte actividad antibiótica y actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasa, mientras que el éster

20 de tritilo de las penicilinas conocidas, por ejemplo, no muestran ninguna actividad antibiótica sustancial. Por otra parte, dicho éster de tritilo de fórmula (II-a) es muy importante como uno de los ésteres activos e intermediarios de utilidad

para la síntesis de otros productos farmacéuticamente útiles, puesto que el grupo tritilo se puede disociar fácilmente.

Las propiedades físico-químicas y biológicas del éster de tritilo del antibiótico PS-5 de esta invención, se ofrecen detalladamente a continuación.

Propiedades físico-químicas del éster de tritilo del antibiótico PS-5

A) Punto de fusión

El éster de tritilo funde entre 83 y 88°C. En este caso, el punto de fusión se mide mediante el método de Kofler con una velocidad de elevación de la temperatura de 1°C por minuto (aparato: aparato de ensayo del punto de fusión tipo BY-1, Yazawa Scientific Mfg. Co. Ltd.).

B) Espectro de absorción ultravioleta

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 315,5 \text{ nm}$$

C) Espectro de absorción infrarroja

Los máximos de absorción más característicos en solución clorofórmica, se presentan a las siguientes longitudes de onda: 3430, 3100-3000, 2990, 2950, 1770, 1695, 1665, 1445, 1340, 1275 y 1139  $\text{cm}^{-1}$ .

D) Solubilidad

Es sustancialmente insoluble en agua, hexano y éter de petróleo (punto de ebullición: 30-60°C); soluble en benceno, acetato de etilo, cloroformo, acetona y dimetil-sulfóxido.

E) Reacción de color

Reacción con el reactivo de Ehrlich:	positiva
Reacción con cloruro de trifeniltetrazolio:	negativa
Reacción con cloruro férrico:	negativa

Reacción con yodoplatinato: positiva  
Reacción con hidroxilamina-cloruro férrico: positiva  
Reacción con el reactivo cloro-tolidina: positiva  
Reacción con ninhidrina: negativa.

- 5 F) Color de la sustancia: incolora  
G) Cromatografía de capa fina (TLC)

Los valores Rf sobre las placas y con los disolventes indicados a continuación, son los siguientes:

- (a) "Hoja de cromatograma No. 6065" (Eastman Kodak Co.)  
10 Capa superior de n-Butanol/Etanol/Agua (4/1/5) Rf = 0,56  
i-Propanol/agua (8/7) Rf = 0,91  
n-Butanol Rf = 1,0  
i-Propanol/agua (1/4) Rf = 1,0  
(b) Placas de gel de sílice pre-revestidas 60 F<sub>254</sub>  
15 (E. Merck) Benceno/Acetona (2/1) Rf = 0,29

H) Espectro de resonancia magnética nuclear protónica

El espectro NMR a 100 MHz del éster tritílico en CDCl<sub>3</sub> revela las siguientes señales características:

- 20 i) un triplete centrado en aproximadamente 1,10 ppm con constantes de acoplamiento en 7 Hz aproximadamente.  
ii) un singlete cerca de 1,86 ppm.  
iii) un multiplete en 7 a 7,67 ppm aproximadamente.

Las anteriores propiedades físico-químicas son consistentes con la estructura (II-a).

- 25 En particular, los siguientes hechos confirman definitivamente que el producto de tritilación del antibiótico PS-5 es un éster.

- (i) una amplia absorción IR de -COO<sup>-</sup> en aproximadamente 1640 - 1540 cm<sup>-1</sup> que se muestra en el espectro IR del antibiótico PS-5 (sal sódica) y no observa en el espectro IR del éster.
- 30

trifílico del mismo. En su lugar, el éster de tritilo proporciona una fuerte absorción de un grupo !CO- en una mitad éster en  $1695\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente.

5 (ii) el antibiótico PS-5 no puede extractarse sustancialmente con disolvente a partir de una solución acuosa neutra o debilmente alcalina, pero el éster de tritilo se puede extraer facilmente.

10 (iii) el máximo de absorción UV del antibiótico PS-5 se encuentra en 301 nm, mientras que el del éster trifílico se encuentra en 315,5 nm. Este cambio es análogo al existente en el caso del éster metílico de N-acetil-tienamicina.

#### Propiedades biológicas del éster trifílico de antibiótico PS-5

##### (1) Espectro antibiótico

15 El éster de tritilo del antibiótico PS-5 tiene una actividad antibiótica de amplio espectro y en particular muestra una actividad muy fuerte contra las diversas bacterias gram-positivas pertenecientes a los géneros tales como Staphylococcus, Diplococcus, Streptococcus, Sarcina, Bacillus y similares y contra bacterias gram-negativas pertenecientes a géneros tales como Alcaligenes, Comamonas, y similares.

20 El éster de tritilo del antibiótico PS-5 muestra también una buena actividad contra bacterias gram-negativas pertenecientes a géneros tales como Escherichia, Klebsiella, Proteus, y similares.

25 Una notable característica demostrada por el éster de tritilo del antibiótico PS-5 es su fuerte actividad contra bacterias gram-negativas que son resistentes a los antibióticos que tienen una estructura de anillo de  $\beta$ -lactama y que pertenecen, por ejemplo, a los géneros Citrobacter, Proteus, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, y similares.

30

(2) Aumento de la actividad antibiótica de otros antibióticos contra bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa

El éster de tritilo del antibiótico PS-5 tiene también la capacidad de realzar la actividad antibiótica de otros antibióticos, especialmente de antibióticos de  $\beta$ -lactamales como penicilinas y cefalosporinas, contra bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa tales como Citrobacter freundii, Proteus vulgaris, Enterobacter aerogenes, Serratia marcescens, y similares.

(3) Actividad in vivo

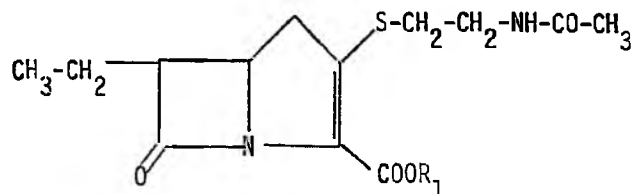
El éster de tritilo del antibiótico PS-5, cuando se administra a ratones infectados con bacterias patógenicas gram-positivas, muestra un notable efecto terapéutico.

(4) Toxicidad

El éster de tritilo no provoca muerte alguna en los animales de ensayo cuando se administra intraperitonealmente a ratones, con una dosis de 500 mg/kg.

Procedimiento de utilización y preparados farmacéuticos del antibiótico PS-5 y sus derivados

El antibiótico PS-5 y sus derivados, descritos anteriormente, pueden representarse por la siguiente fórmula general:



en la que  $R_1$  es hidrógeno, alquilo inferior y trifenilmetilo, incluyendo las sales del compuesto cuando  $R_1$  es hidrógeno. En la fórmula general anterior, el término "alquilo inferior" se define del mismo modo que anteriormente para el símbolo R de la fórmula II que representa los ésteres del antibiótico PS-5. La expresión "las sales del compuesto cuando  $R_1$  es hidrógeno", representa las sales del antibiótico PS-5 como anteriormente se han definido en el párrafo que ilustra los derivados del antibiótico PS-5, e incluye evidentemente también a las sales farmacéuticamente aceptables de dicho antibiótico.

El antibiótico PS-5 y sus derivados, particularmente el éster de tritilo, exhiben actividad in vitro e in vivo contra microorganismos gram-negativos y gram-positivos y por tanto son de utilidad para controlar y evitar infecciones bacteriales en animales de ensayo.

El antibiótico PS-5 o su éster de tritilo y sus composiciones pueden administrarse oralmente, localmente o parenteralmente (intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, etc.) y se pueden utilizar en diversos preparados farmacéuticos usuales, en función del método de administración. Por ejemplo, el antibiótico PS-5 o su éster tritílico se puede combinar con un vehículo, diluyente o similar, farmacéuticamente aceptables, en formas sólidas (por ejemplo, tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, tabletas revestidas de azúcar, comprimidos, pulverizaciones en polvo, supositorios, etc.), formas semisólidas (por ejemplo, unguentos, cremas, cápsulas semi sólidas, etc., o formas líquidas (por ejemplo, soluciones, emulsiones, suspensiones, lociones, jarabes, solución para inyección, pulverizaciones líquidas, etc.).

La unidad de dosificación conteniendo al antibiótico

PS-5 o su éster de tritilo, puede contener generalmente de 0,1 a 99 % en peso del componente activo en cualquiera de las formas líquida, semisólida y sólida.

5 Ejemplos representativos de aditivos utilizables como vehículos, cargas, diluyentes o similares, que pueden emplearse para estos preparados y también el método de preparación se describen a continuación:

10 Las tabletas y cápsulas para administración oral pueden tener cualquier forma de unidad de dosificación, pudiendo contener agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona y similares; cargas, por ejemplo, lactosa, sucrosa, almidón, fosfato de calcio, sorbitol, glicina y similares; lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol, sílice  
15 y similares; desintegrantes, por ejemplo almidón de patata y similares; o agentes humectantes tales como laurilsulfato de sodio y similares. Las tabletas se pueden revestir de acuerdo con los métodos ya revestidos en la técnica.

20 Los preparados líquidos para uso oral pueden tener la forma de suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes, etc., oleosas o acuosas, o pueden proporcionarse como productos secos que pueden ser confirmados con agua u otros vehículos adecuados antes de su empleo. Los preparados líquidos para uso oral pueden contener los siguientes ingredientes farmacéu-  
25 ticamente aceptables: agentes de suspensión (por ejemplo, metilcelulosa, jarabe de sorbitol, jarabe de azúcar, hidroxietilcelulosa, gelatina, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio, grasas y aceites hidrogenados comestibles); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina de acacia, mono-  
30 oleato de sorbitán); vehículos no acuosos (por ejemplo, alcohol

etílico, propilenglicol, ésteres oleosos, aceite de coco fraccionado, aceite de almendras); agentes preservativos (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, ácido sórbico).

5                    Los supositorios pueden contener las bases convencionales para supositorios, de tipo manteca de cacao y los diversos glicéridos.

10                    Las composiciones para inyección se pueden preparar en una forma de unidad de dosificación en ampollas o en recipientes de dosis múltiples con un agente preservativo. Se pueden elaborar en forma de suspensiones, soluciones y emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y, si es necesario, pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, agentes dispersantes y agentes estabilizantes. Alternativa-  
15                    mente, el antibiótico de la presente invención se puede preparar en forma de polvo el cual se puede combinar con agua estéril, libre de pirógenos, antes de su empleo.

20                    Las composiciones que contienen al antibiótico PS-5 y su éster de tritilo, se pueden proporcionar en diversas formas adecuadas para la absorción a través de la membrana mucosa de la nariz, garganta y tubo bronquial. Por ejemplo, para dichas finalidades serán ventajosas las formas de polvo o pulverizaciones líquidas, inhalaciones, comprimidos, tinturas para la garganta, etc. Para el tratamiento de los oídos y ojos, el  
25                    antibiótico de la presente invención se puede preparar como cápsulas individuales, en forma de gotas, en forma líquida o semisólida, etc. En adición, para la aplicación local, se puede presentar como formulaciones en bases hidrófilas o hidrófobas tales como polvos, lociones, cremas, unguentos y similares.  
30

Si se desea, y además del vehículo, las composiciones descritas anteriormente pueden contener otros ingredientes, por ejemplo, agentes preservativos, antioxidantes, lubricantes, agentes de viscosidad, agentes sazonzantes, agentes de suspensión, aglutinantes, agentes estabilizantes y similares.

Cuando el antibiótico PS-5 y/o su éster de tritilo han de ser utilizados para fines tales como el tratamiento de infecciones en cerdos, vacas, ovejas, pollos y similares, las formulaciones se pueden presentar como preparados intramamarios en bases de larga actuación o de liberación rápida, por ejemplo o como concentrados aditivos para alimentos. Las composiciones farmacéuticas anteriormente descritas pueden contener, según la presente invención, al antibiótico PS-5 y/o su éster de tritilo como único ingrediente activo o en combinación con otros ingredientes terapéuticamente eficaces.

Como anteriormente se ha explicado detalladamente, debido a que el antibiótico PS-5 y su éster de tritilo tienen un efecto sinérgico sobre varias bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasa en combinación con los compuestos de  $\beta$ -lactama, será ventajoso combinarlos con los compuestos de  $\beta$ -lactama en las composiciones farmacéuticas. Como ejemplos adecuados de compuestos de  $\beta$ -lactama pueden mencionarse los derivados de penicilina tales como bencilpenicilina, fenoximetilpenicilina, carbenicilina, ampicilina y amoxicilina; y los derivados de cefalosporina tales como cefaloridina, cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefoxitina, cefacetilo, cefamandol, cefapirina, cefradina y cefaloglicina.

Cuando el antibiótico PS-5 y/o su éster de tritilo se combinan con uno o más elementos de los compuestos de  $\beta$ -lactama anteriormente indicados, la proporción de combina-

ción del antibiótico de esta invención a los compuestos de  $\beta$ -lactama conocidos, no constituye un factor crítico, pero puede variar en una amplia gama. Sin embargo, y desde el punto de vista práctico, será aconsejable utilizar la proporción

5      cuantitativa del antibiótico de esta invención a los compuestos de  $\beta$ -lactama conocidos en la gama de 20:1 a 1:150, preferiblemente 10:1 a 1:100.

En el tratamiento de infecciones bacteriales en mamíferos, la dosis del antibiótico PS-5 y/o su éster de tritilo puede variarse en función del sujeto a tratar, peso corporal,

10      tipo, severidad y síntoma de la infección, modo y número de administración, etc. Para la administración oral o parenteral usual, será aconsejable utilizar la dosis diaria del orden de 0,05 a 500 mg/kg, preferiblemente de 0,5 a 200 mg/kg, más

15      preferiblemente en una dosificación dividida. Es evidente que una dosis superior a la gama recomendada anteriormente, puede utilizarse también en función de las condiciones individuales del sujeto a tratar. El antibiótico PS-5 y/o su éster de tritilo no solo pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas

20      como anteriormente se han explicado, sino que también pueden añadirse directamente o como concentrados aditivos alimenticios a los alimentos para animales. En adición, se pueden utilizar como ingredientes activos para agentes preservativos o desinfectantes de alimentos.

Los siguientes ejemplos ilustrarán la presente invención. En todos los ejemplos, los ensayos cuantitativos y cualitativos de la actividad antimicrobial están basados en los siguientes métodos:

(1) Bio-ensayo de la actividad antimicrobial

El cultivo nocturno de Comamonas terrigena B-996

sobre un tubo inclinado de agar nutriente se suspende en caldo nutriente para dar una densidad celular óptica de 0,040 a 610 nm.

5 La suspensión de semillas se añade en una cantidad de 1% a un medio de agar fundido que contiene 0,8 % de polvo de caldo nutriente Kyokuto (Kyokuto Pharmaceutical Industries Co.) y 1 % de Bacto-Agar (Difco Laboratories). Se distribuyen 7 ml del medio de agar fundido germinado en un plato Petri (9 cm de diámetro) y se solidifica. Esto se define como una  
10 placa de ensayo de Comamonas.

Se cultiva durante la noche Staphylococcus aureus FDA 209P en caldo nutriente con agitación y se diluye 50 veces en caldo nutriente para proporcionar una suspensión de semillas. Se mezcla una cantidad de 1% (v/v) de la suspensión de semilla  
15 con el medio de agar fundido que contiene 1% de polvo de caldo nutriente Kyokuto (Kyokuto Pharmaceutical Industries Co.) y 1% Bacto-Agar (Difco Laboratories). 7 ml de los medios de agar fundido germinados se vierten y gelifican en un plato Petri (9 cm de diámetro). Esto se define como una placa de ensayo  
20 de Staphylococcus.

De forma similar, se prepara una placa de ensayo para Alcaligenes. El cultivo inclinado en agar nutriente de Alcaligenes faecalis B-326, de una noche de edad, se suspende en caldo nutriente para proporcionar la suspensión de semillas,  
25 cuya concentración celular se ajusta a una densidad óptica de 0,020 a 610 nm. El medio de agar compuesto de 0,5 % de polvo de caldo nutriente Kyokuto (Kyokuto Pharmaceutical Industries Co.) y 1,0% Bacto-Agar (Difco Laboratories) se funde a una temperatura permisible y se germina con un inóculo al 1% de la  
30 suspensión de semillas. Se distribuyen 7 ml del medio de agar

fundido germinado en un plato Petri de 9 cm de diámetro y se deja gelificar. Esta preparación se define como placa de ensayo para Alcaligenes.

5 Un disco de pulpa de 8 mm se impregna normalmente con una solución de muestra a ensayar, se deja sobre una hoja limpia de papel de filtro durante un tiempo suficiente para separar el exceso de solución y se transfiere entonces a una placa de ensayo. Después de incubar a 35°C durante 20 horas, se mide el diámetro de la zona de inhibición observada y se  
10 compara con soluciones standard de cefaloridina. La actividad antimicrobial del antibiótico PS-5 y compuestos relacionados se expresa como unidades equivalentes de cefaloridina/ml. Más particularmente, una solución del antibiótico PS-5 y compuestos relacionados de la presente invención que muestra el mismo diámetro de zona de inhibición que 100<sub>3</sub> ug/ml de cefaloridina, se expresa como 100 unidades de cefaloridina/ml. Similarmente, cuando una muestra sólida del antibiótico PS-5 y compuestos relacionados de esta invención exhibe, a una concentración de 1 mg/ml, el mismo diámetro que 1 ug/ml de cefaloridina. la actividad específica de la muestra sólida se expresa como una  
20 unidad de cefaloridina/mg. Como será bien conocido para los expertos en la materia, la curva standard del ensayo varía en cierto grado, en función de la especie del microorganismo a ensayar. Para especificar la especie de los microorganismos de ensayo, se utiliza la siguiente expresión de unidad: unidad Comamonas-cefaloridina (abreviado como CCU); unidad Staphylococcus-cefaloridina (abreviado como SCU); y unidad Alcaligenes-cefaloridina (abreviado como ACU).

25 (2) Bio-autografía

30 Se prepara una placa de ensayo grande como se des-

cribe en (1) anteriormente, excepto que se vierten 100 ml del medio de agar fundido germinado en una placa rectangular de 32 x 24 cm en lugar de una placa Petri de 9 cm.

5 Se coloca un cromatograma de papel a ensayar durante 15 minutos sobre la citada placa de ensayo grande. Después de separar el papel, la placa de ensayo se incuba a 35°C durante 20 horas para revelar la zona o zonas de inhibición. Esta técnica no solo permite calcular el valor o valores R<sub>f</sub> (ensayo cualitativo), sino también determinar la actividad antimicrobial (ensayo semi-cuantitativo) basado en el tamaño del halo.

15 En el caso de que se utilice una placa TLC, se intercala una hoja de papel fino entre la placa TLC y la superficie de la placa de ensayo. Se lleva a cabo un procedimiento similar para los ensayos cualitativo y semi-cuantitativo.

#### EJEMPLO 1

20 Un matr az Erlenmeyer de 500 ml, que contiene el siguiente medio de cultivo germinado (SE-4), se esteriliza a 120°C durante 15 minutos. A un cultivo inclinado bien esporulado de Streptomyces sp. A271, se añaden 10 ml de una solución al 0,02 % de Tween-80 (un surfactante de Atlas Powder Corp.) y la mezcla se agita ligeramente para producir la suspensión de esporas. El matr az Erlenmeyer de 500 ml se inocula con 1 ml de la suspensión de esporas y se cultiva con vibración a 28°C durante 48 horas en un vibrador rotativo (200 rpm; radio de círculo 3,5 cm). A continuación, se inoculan 2 ml del cultivo de semillas en cada uno de los seis matracas Erlenmeyer de 500 ml conteniendo cada uno de ellos 100 ml de los medios de producción descritos a continuación y se cultiva con vibración 25 30 a 28°C durante 48-96 horas en un vibrador rotativo.

MEDIO DE CULTIVO GERMINADO (SE-4)

	Extracto de carne de vaca (Difco Laboratories)	0,3 % (p/v)
	Bacto-triptona (Difco Laboratories)	0,5
	Glucosa	0,1
5	Almidón soluble	2,4
	Extracto de levadura	0,5
	Carbonato cálcico	0,4
	Harina de soja desgrasada	0,5
	pH 7,5 antes de la esterilización;	
10	pH 7,1 después de la esterilización;	
	pH 7,4 después de dos días de fermentación.	

MEDIOS DE PRODUCCION

	(1) medio AG-1	
	Glucosa	1,5% (p/v)
15	Almidón de maíz	2,5
	Licor de maceración de maíz	2,0
	Levadura seca	1,0
	D,L-metionina	0,1
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00013
20	pH 7,2 antes de la esterilización;	
	pH 6,1 después de la esterilización;	
	pH 7,8 después de cuatro días de fermentación.	
	(2) medio AGA-2	
	Glucosa	1,5% (p/v)
25	Almidón de patata	2,5
	Licor de maceración de maíz	2,0
	Levadura seca	1,0
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00013
	pH 6,5 antes de la esterilización;	
30	pH 5,8 después de la esterilización;	
	pH 7,8 después de 4 días de fermentación.	

	(3) Medio AGB-1	
	Maltosa	3,0% (p/v)
	Licor de maceración de maíz	1,0
	Levadura seca	1,0
5	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0001
	pH 6,5 antes de la esterilización;	
	pH 5,9 después de la esterilización;	
	pH 7,9 después de cuatro días de fermentación;	
	(4) Medio AGB-41	
10	Maltosa	5,0 % (p/v)
	Almidón soluble	1,0
	Glicerina	0,3
	Levadura seca	2,5
	NaCl	0,5
15	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05
	CaCO <sub>3</sub>	0,3
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00013
	pH 7,0 antes de la esterilización;	
20	pH 6,9 después de la esterilización;	
	pH 7,9 después de cuatro días de fermentación.	
	(5) Medio ML-19	
	Glicerina	4,0 % (p/v)
	Peptona	0,5
25	Glucosa	0,2
	Almidón de patata	0,2
	Harina de soja desgrasada	0,5
	Levadura seca	0,5
	NaCl	0,5
30	CaCO <sub>3</sub>	0,2
	pH 6,4 antes de la esterilización;	
	pH 7,0 después de la esterilización;	
	pH 7,0 después de 4 días de fermentación.	

(6) Medio AGO-1

	Aceite de soja	3,0 % (p/v)
	Levadura seca	2,0
	NaCl	0,5
5	$K_2HPO_4$	0,05
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05
	$CaCO_3$	0,3
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,00013
	pH 7,0 antes de la esterilización;	
10	pH 7,2 después de la esterilización;	
	pH 7,2 después de cuatro días de fermentación.	

La potencia antibiótica del filtrado de cultivo se determina por el ensayo del disco como anteriormente se ha descrito, utilizando Comamonas terrigena B-996, Staphylococcus aureus 209P y Alcaligenes faecalis B-326. Los resultados observados a las 72 horas después de la inoculación, son los siguientes:

Tabla 5

Medio	Potencia antibiótica		
	CCU/ml	SCU/ml	ACU/ml
AG-1	105	1,1	420
AGA-2	72	1,1	420
AGB-1	105	0,9	340
AGB-41	185	8,9	440
ML-19	60	1,4	122
AGO-1	67	0,9	340

EJEMPLO 2

Se transfieren 100 ml del cultivo de semillas preparado como en el ejemplo 1 a un fermentador de jarra de 30 litros que contiene 15 litros del medio ML-19 y se cultiva bajo aireación forzada a 28°C durante 96 horas, a 200 rpm, siendo alimentado el aire estéril a una velocidad de 7,5 litros/minuto. Como antiespumante se utiliza un aceite de silicona (Silicone KM-75, Shin-Etsu Chemical Industries Co., Ltd.) a una concentración de 0,05 %. El caldo de fermentación se recoge y centrifuga en los tiempos indicados. La potencia antibiótica del filtrado de cultivo es como sigue:

Tabla 6

Tiempo	Potencia (CCU/ml)	valores pH
24 horas	19	7,0
48	48	7,2
72	72	7,1
96	59	7,0

EJEMPLO 3

Usando un proceso similar al descrito en el ejemplo 1, se cultiva Streptomyces sp. A271 en un matr az Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio SE-4 y a continuación se inocula en un fermentador de jarra de 30 litros que contiene 15 litros del medio SE-4. Después de cultivar a 28°C durante 24 horas, a 200 rpm, bajo aireación forzada de 7,5 litros/minuto, se vierte 1 litro del cultivo de semillas en un fermentador de tanque de acero inoxidable de 200 litros que contiene 100 litros del medio ML-19. El tanque fermentador se airea bajo agitación a 28°C, durante 72 horas, a 100 rpm, manteniéndose

la velocidad de aireación en 50 litros/minuto. El pH inicial es de 7 mientras que el pH final es de 7,1. El caldo se mezcla con 5 % (p/v) de perlita (Topco Perlite, Topco No. 34, Toko Perlite Kogyo K.K.) y se filtra a través de un filtro prensa para dar 80 litros de filtrado de cultivo. La potencia antibiótica del licor claro es de 60 CCU/ml.

#### EJEMPLO 4

##### PREPARACION DEL CONCENTRADO DE CARBON ACTIVO

Como se describe en el ejemplo 1, se incuban 10 matraces Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 100 ml cada uno del medio ml-19, bajo vibración, durante 72 horas. Al caldo combinado, se añade 2 % (p/v) del auxiliar de filtración perlita (Topco Perlite, Topco No. 34 Toko Perlite Kogyo K.K.) y se filtra a través de un embudo Buchner para dar 800 ml del filtrado de cultivo. Después de confirmar que el pH se encuentra en la gama de 7-8, se añaden 16 g de carbón activo (Charcoal Activated, Shirasagi; Takeda Chemical Industries, Ltd.) y se agita durante 15 minutos. El carbón activo se recoge por centrifugado; se lava con 800 ml de agua destilada; y a continuación se centrifuga. El carbón activo así recuperado se eluye con 400 ml de acetona al 50% (v/v) bajo agitación, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. La solución sobrenadante obtenida (eluido) (52 CCU/ml) se concentra a 50 ml a una temperatura de 30-35°C en un evaporador rotativo. El título antibiótico del concentrado es de 800 CCU/ml.

Se llevan a cabo los siguientes experimentos con el fin de demostrar claramente que el antibiótico PS-5 de esta invención es diferente del MM4550 (Complejo) el cual se describe como inhibidor de  $\beta$ -lactamasa en las solicitudes alemanas DOS 2.513.855 y DOS 2.513.854.

Se cultivan tres cepas de Streptomyces olivaceus ATCC 31126 (=ATCC 21379/M3), ATCC 21380 y ATCC 21382 a 28°C durante 72 horas, sobre un vibrador rotativo, en un matr az Erlenmeyer de 500 ml que contiene 100 ml del siguiente medio:

5	Harina de soja (ESSAN-M (calidad especial); Ajinomoto Co., Ltd.)	1,0
	Glucosa	2,0
	CaCO <sub>3</sub>	0,2
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,001
10	pH antes del autoclaveado	

La actividad antibiótica del caldo filtrado se adsorbe sobre carbón activo, se lava con agua y se eluye con acetona al 50%. El eluado obtenido se concentra a un pequeño volumen bajo presión reducida y se somete a cromatografía de papel descendente bajo las condiciones a continuación indicadas:

15	Papel filtro: Papel filtro Toyo No. 50 (Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)	
	Sistema disolvente: (sistema 80% Acetonitrilo/Tris/EDTA)	
	acetonitrilo	: 120 ml
	M/10 tris(hidroximetil)aminometano-HCl (pH 7,5)	: 30 ml
20	M/10 etilendiamina-tetra-acetato tetrasódico (pH 7,5)	: 1 ml.

Los valores R<sub>f</sub> se revelan por bio-autografía bajo las citadas condiciones sobre Comamonas terrigena B-996.

Paralelamente con las tres cepas anteriores de Streptomyces olivaceus, se fermenta Streptomyces sp. A271 de la presente invención en un medio compuesto de 4% de glicerina, 0,2 % de glucosa, 0,5 % de peptona, 0,2 % de almidón de patata, 0,5 % de harina de soja desgrasada, 0,5 % de levadura seca, 0,5 % de cloruro sódico y 0,2 % de carbonato cálcico (pH 6,4 antes del autoclaveado). El ulterior tratamiento y en-

30

sayo son iguales a los descritos anteriormente.

Los ensayos bio-autográficos demuestran que el antibiótico PS-5, un producto de Streptomyces sp. A271 de esta invención, es un nuevo producto diferente al MM 4550 (Complejo) descrito en las citadas solicitudes alemanas.

EJEMPLO 5

PREPARACION DEL ELUADO DIAION HP20 CONCENTRADO DEL ANTIBIOTICO PS-5

Como se describe en el ejemplo 1, se fermentan 15 litros del medio ML-19 en 150 matraces durante 72 horas. Al caldo recogido, se añaden 100 mg de etilendiamina-tetraacetato disódico y 2 % (p/v) de Topco Perlite, Topco No. 34 y se filtra a través de un embudo Buchner grande para dar 14,1 litros de filtrado de caldo (pH 7,9). Este se carga sobre una columna DIAION HP20 de 7 x 50 cm (un copolímero de estireno/divinilbenceno de alta porosidad en forma de perlas, con una estructura macro-reticular y fabricado por Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.), se lava con 7 litros de agua destilada y se eluye con metanol al 50% (v/v). El modelo de elución de la actividad antibiótica es como sigue (Tabla 7):

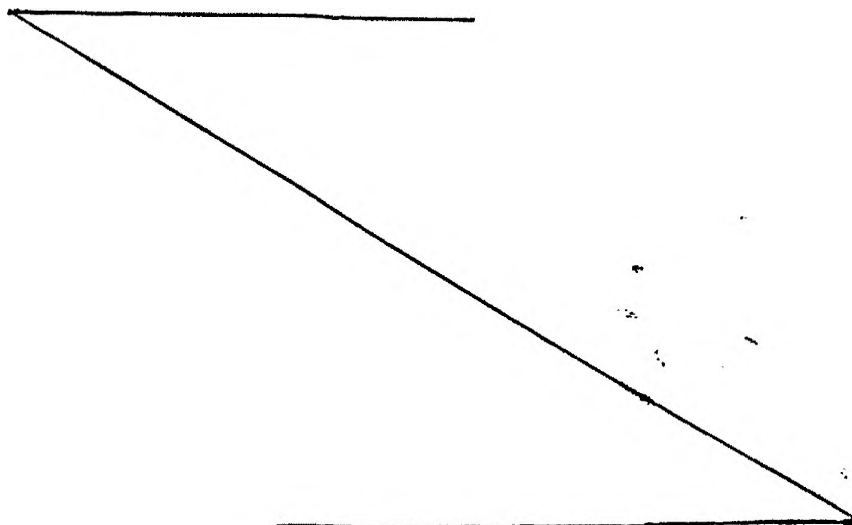


Tabla 7

Actividad cargada: 40 CCU/ml x 14.000 ml.

<u>Eluido No.</u>	<u>Volúmen (ml)</u>	<u>Potencia (CCU/ml)</u>
1	1.000	0
2	500	0
3	500	0
4	50	19
5	50	37
6	50	72
7	50	150
8	50	270
9	50	850
10	50	870
11	50	300
12	50	270
13	50	230
14	50	200
15	50	170
16	50	125
17	50	105
18	50	87
19	50	75
20	50	60
21	50	48
22	50	38
23	50	27
24	50	18
25	50	14
26	50	10
27	50	0
28	50	0
29	50	0

Se combinan los eluidos Nos. 8 a 14, se concentran a 100 ml a una temperatura inferior a 30°C en un evaporador rotativo y a continuación se liofilizan para proporcionar 2,6 g de un polvo de color marrón amarillento cuya potencia es de 54 CCU/mg. Dicho polvo de color marrón amarillento se disuelve en agua destilada a una concentración de 500 CCU/ml.

Se preparan soluciones tampón fosfato de los valores pH indicados ajustando fosfato dipotásico M/15 al pH

deseado con hidróxido sódico 5N o ácido fosfórico 5N. A 1 ml de la solución de antibiótico PS-5, se añade 1 ml del tampón fosfato y, si es necesario, se vuelve a ajustar el pH al valor inicial. Las soluciones de antibiótico PS-5, con varios pH, se mantienen a 60°C durante 30 minutos en un baño de agua, se enfría en agua corriente y se neutraliza a pH 7 con una pequeña cantidad de hidróxido sódico 5N o ácido fosfórico 5N. El tubo de control que contiene solución de antibiótico PS-5 a pH 7, se coloca en un baño de hielo durante 30 minutos. La restante actividad antimicrobial se determina como anteriormente se ha descrito, utilizando Comamonas terrigena B-996 como microorganismo de ensayo. Los resultados mostrados en la siguiente tabla se calculan como porcentaje del control:

pH	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
Actividad restante (%)	0	0	9,0	79,0	76,5	88,5	82,0

Estos resultados demuestran que el polvo de color marrón amarillento obtenido en este ejemplo es claramente estable a un pH del orden de 6 a 9 durante 30 minutos a 60°C. En adición, la estabilidad del antibiótico PS-5 parece aumentar a una temperatura inferior, incluso a un pH ácido. Por ejemplo, después de tratarse el antibiótico PS-5 a pH 3 durante 5 minutos a -17°C, se detecta todavía por lo menos un 30% de la actividad antibiótica inicial.

EJEMPLO 6

EXTRACCION A BAJA TEMPERATURA CON n-BUTANOL

Un tubo de ensayo grande conteniendo 20 ml de agua destilada, 12 ml de n-butanol y 7 g de cloruro sódico, se enfría hasta -17°C sin congelación. El polvo de color marrón ama-

5 rillento del antibiótico PS-5 obtenido en el ejemplo 5, se diluye a una concentración de 200 mg/ml en agua destilada y se pre-refrigera. Al tubo de ensayo se añade 1 ml de la solución fría del antibiótico PS-5 y se ajusta rápidamente a un pH de 2,75, 3 ó 3,25 con ácido sulfúrico, mientras la temperatura de la mezcla se mantiene por debajo de -10°C. Después de mezclar, la capa de n-butanol se recupera y se mezcla bien con 5 ml de tampón fosfato 0,5 M (pH 6,8) con lo cual el componente activo se transfiere a la capa acuosa. El bio-ensayo de la solución acuosa proporciona la siguiente extractabilidad de antibiótico PS-5 del polvo de color marrón amarillento:

pH	% extracción
2,75	35 %
3,00	32
3,25	16

EJEMPLO 7

PREPARACION DEL POLVO QAE-SEPHADEX

20 Por el mismo procedimiento del ejemplo 5, se obtienen 27,7 g del polvo de color marrón amarillento de antibiótico PS-5 a partir de 100 litros de filtrado de caldo después de liofilizar. Este polvo (actividad específica 13,2 CCU/mg) se disuelve en 30 ml de tampón fosfato 25 mM (pH 6,8) y se aplica a una columna de QAE-Sephadex A-25 (una resina intercambiadora de aniones, fuertemente básica, totalmente cuaternizada, obtenida por introducción de grupos dietil-2-hidroxipropilamonio en gel de dextrano; producida por Pharmacia Fine Chemicals AB) (3,3 x 25,0 cm) que había sido equilibrada con el mismo tampón. Después de lavar con una pequeña cantidad del mismo tampón fosfato, la actividad se eluye con el mismo tampón conteniendo cloruro sódico, siendo la concentración de cloruro sódico

5 cambiada linealmente desde 0 a 0,5 M durante la elución. La fracción activa (300 ml) se enfría a 0°C y se trata con 6 g de carbón activo. El carbón activo se recoge, se lava con agua y se eluye con acetona al 50% (v/v). Después de separar la acetona por evaporación a una temperatura inferior a 30°C, se recuperan por liofilización 727 g de polvo de color amarillo parduzco de la sal sódica de antibiótico PS-5. La actividad específica de este preparado es de 264 CCU/mg.

10 EJEMPLO 8

PREPARACION DEL POLVO DEAE-CELLULOSE

15 El polvo de color amarillo parduzco (727 mg) del antibiótico PS-5 obtenido en el ejemplo 7, se disuelve en 1 ml de tampón fosfato 25 mM (pH 6,8) y se carga en una columna (1,5 x 27 cm) de Bio-Gel P-2 (una composición de polímero sintético reticulado, en perlas, gelificado, basado en copolímero de metileno-bis-acrilamida; producido por BIO-RAD Laboratories) que había sido equilibrada con el mismo tampón fosfato. Al desarrollar con el mismo tampón fosfato, se obtiene la fracción activa (15 ml).

20 La fracción activa obtenida se aplica entonces sobre una columna (2,5 x 28 cm) de dietilaminoetil (DEAE) celulosa DE32 (Whatman Ltd.) que había sido equilibrada con el mismo tampón fosfato. La elución se efectúa con un gradiente lineal de cloruro sódico en el mismo tampón fosfato desde 0 a 25 0,5 M. La fracción activa recuperada (240 ml) se adsorbe sobre 4,5 g de carbón activo a una temperatura de 0°C. El carbón activo se recoge por filtración, se lava con agua y se eluye con acetona al 50% (v/v). El eluido de acetona se evapora a una temperatura inferior a 30°C hasta que no se detecta acetona y a continuación se liofiliza para proporcionar 120 mg de polvo 30 de color blanco parduzco de la sal sódica del antibiótico PS-5.

La actividad específica de este preparado es de 600 CCU/mg.

EJEMPLO 9

PREPARACION ALTAMENTE PURIFICADA DEL ANTIBIOTICO PS-5

5 Se llenan dos tanques de fermentación de acero  
inoxidable, de 200 litros, con 100 litros cada uno del  
medio ML-19 conteniendo 2,5 % de harina de soja desgrasada,  
se autoclavean, se inoculan con Streptomyces sp. A271 de la  
misma forma descrita en el ejemplo 3, y se fermenta durante  
72 horas bajo aireación y agitación. Los contenidos de los  
10 dos tanques de fermentación se combinan, se mezclan con 5 %  
(p/v) de Topco Perlite, Topco No. 34 (Topco Perlite Kogyo K.K.)  
y se filtra a través de un filtro prensa para dar 160 litros  
de filtrado de caldo de cultivo. El título antibiótico de este  
filtrado es de 235 CCU/ml. Este filtrado de caldo se pasa a  
15 través de una columna de resina intercambiadora de iones DIAION  
PA-306 (una resina intercambiadora de aniones fuertemente bási-  
ca que tiene una matriz reticulada de poliestireno y mitades  
de cloruro de trimetilamonio; producida por Mitsubishi Chemical  
Industries Ltd.; 10 x 52 cm; 4,5 litros en volúmen húmedo) sin  
20 retención. A continuación la actividad pasada a través de la  
columna se absorbe sobre una columna de DIAION HP-20 (14 x 97  
cm; 15 litros) y se eluye con metanol al 75%. El eluido activo  
recogido (2 litros: 9.854 CCU/ml) se diluye tres veces con  
4 litros de agua y se aplica a una columna de 2 litros (5,5 x  
25 84 cm) de DIAION PA-306S. Después de lavar con 500 ml de agua,  
la actividad antibiótica se eluye con un gradiente lineal de  
8 litros de cloruro sódico desde 0 a 3 % y se recoge en frac-  
ciones de 200 ml. Las fracciones activas Nos. 17 a 31 se combi-  
nan para preparar 2,8 litros del eluido activo (4.120 CCU/ml).  
30 Este eluido se carga entonces en una columna de DIAION HP-20

de 1 litro (4,5 x 63 cm) y se eluye con un gradiente lineal de 3 litros de acetona desde 0 a 25 %. El volúmen de cada fracción es de 30 ml. El eluido activo (390 ml; 27.220 CCU/ml) se recupera combinando las fracciones antimicrobialmente activas Nos. 54 a 66.

Después de separar la acetona por destilación bajo presión reducida, el eluido de DIAION HP-20 se pasa a través de una columna de 200 ml de QAE-Sephadex A-25 (2,5 x 41 cm). La actividad antimicrobial se recoge en fracciones de 10 ml por elución con un gradiente lineal de 2 litros de cloruro sódico (0-1,5 %). Las fracciones nos. 68 a 81 son unificadas como eluido activo (140 ml; 42.120 CCU/ml).

Este eluido de QAE-Sephadex A-25 se ajusta cuidadosamente a un pH de 8,3 con 1 % de hidróxido sódico y se carga en una columna de 200 ml de DIAION HP-20AG (Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.; 2,5 x 41 cm). La elución de gradiente lineal se efectua con 1 litro de acetona acuosa, desde 0 a 10%. El volúmen de cada fracción es de 10 ml. Las fracciones Nos. 48 a 53 se combinan para dar 60 ml de eluido activo (45.000 CCU/ml). La liofilización proporciona 249 mg de polvo amarillo (8.000 CCU/mg).

Para una purificación adicional, se disuelven 150 mg del polvo amarillo en una pequeña cantidad de tampón fosfato sódico 0,01 M (pH 8) y se pasa a través de una columna de 130 ml (1,5 x 73 cm) de Sephadex G-10 (un gel de dextrano en forma de perlas preparado por reticulación de fracciones de dextrano con epiclorhidrina; Pharmacia Fine Chemicals AB). El antibiótico PS-5 se desarrolla con tampón fosfato sódico 0,01 M, pH 8, fraccionándose el eluido en una cantidad de 2 ml. Se obtienen 36 ml de eluido activo de las fracciones Nos. 38 a 55

(65.800 CCU/ml).

5 El eluido de Sephadex G-10 se somete entonces a cromatografía en la columna de QAE-Sephadex A-25 (100 ml; 2,0 x 32 cm) seguido por elución con gradiente lineal de 1 litro de solución de cloruro sódico, desde 0 a 1,5 %. El volumen de la fracción es de 10 ml. Las cinco fracciones activas de los Nos. 48 a 52 (50 ml; 22.000 CCU/ml) se combinan como eluido activo. Este eluido activo se ajusta cuidadosamente a un pH de 8,3 con 1 % de hidróxido sódico y se carga en una columna de 10 50 ml de DIAION HP-20 (1,2 x 44 cm).

15 La sal sódica del antibiótico PS-5 se recupera en fracciones de 5 ml por elución en gradiente lineal con 400 ml de acetona acuosa, desde 0 a 10%. Las fracciones activas de los nos. 39 a 41 se combinan y liofilizan para dar 51 mg de polvo blanco (21.000 CCU/mg).

Esta preparación particular de la sal sódica del antibiótico PS-5, demuestra las siguientes propiedades físico-químicas:

- 20 1) Color  
Blanco
- 2) Solubilidad  
Soluble en agua y practicamente insoluble en acetona.
- 3) Punto de descomposición.

25 Cuando se mide en un aparato del punto de microfusión BY-1 (YAZAWA Scientific Mfg. Co., Ltd.) con la temperatura elevada a una velocidad de 1°C/minuto, este preparado no muestra un punto de fusión claro. Comienza a amarillear alrededor de los 148°C y reblandece gradualmente por encima de 160°C. Alrededor de los 203°C, la tonalidad del preparado cambia lentamente desde amarillo a marrón. A 220°C, es una resina 30

de color marrón.

4) Espectro de absorción ultravioleta

Se disuelven 60 microgramos de la sal sódica del antibiótico PS-5 en 3 ml de agua y se mide en un espectrofotómetro Hitachi Modelo EPS-3T (Hitachi Ltd.). La carta registrada se muestra en la figura 1. Se calcularon los siguientes valores característicos:

$$\lambda_{\text{min.}}^{\text{H}_2\text{O}} = \text{aprox. } 246 \text{ nm} (E_1^1 \% \text{ cm} = 82,0)$$

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} = \text{aprox. } 301 \text{ nm} (E_1^1 \% \text{ cm} = 267,5)$$

A una solución acuosa de este preparado (21.000 CCU/mg) en agua destilada, se añade una solución de hidroxilamina (pH 7,5) para hacer que la mezcla de reacción contenga 21,3 g/ug/ml de la sal sódica del antibiótico PS-5 y 10 mM de hidroxilamina. Después de 30 minutos a 22°C, la mezcla de reacción pierde aproximadamente un 94% de la densidad óptica inicial a 301 nm.

5) Espectro de absorción infrarroja

La figura 2 muestra el espectro de absorción infrarroja de la sal sódica del antibiótico PS-5 en KBr, registrado en un espectrofotómetro infrarrojo Hitachi Modelo 215 (Hitachi, Ltd.). Se localizan los siguientes máximos de absorción característicos en las longitudes de onda indicadas:

(i) aprox.  $1750 \text{ cm}^{-1}$  (-CO- en el anillo beta-lactama)

(ii) aprox.  $1650 \text{ cm}^{-1}$  (-CO- en el enlace amida)

(iii) aprox.  $1640 - 1540 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{COO}^\ominus$ )

6) Espectro de resonancia magnética protónica

La carta adjunta (figura 3) es el espectro de resonancia magnética protónica a 100 Mhz de la sal sódica del anti-

biótico PS-5 en agua deuterada, registrado en un espectrómetro RMN JEOL JNM PS-100 (Japan Electron Optics Laboratory Co., Ltd.). Se confirmaron las siguientes señales características:

- (i) triplete que tiene el centro alrededor de 1,06 ppm  
(J = aprox. 7,5 Hz) ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$ )
- (ii) multiplete en la región de 1,72 -2,00 ppm ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$ )
- (iii) singlete alrededor de 2,05 ppm ( $\text{CH}_3\text{-CO-}$ )
- (iv) multiplete en la región de 2,88 - 3,58 ppm ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH-}$ )
- (v) multiplete en la región de 3,9 - 4,20 ppm ( $\text{-CH-}$ )

N

7) Reacción de color

Reactivo Ehrlich	:	positiva
Iodoplatinato	:	positiva
Ninhidrina	:	negativa

8) Rotación específica

$[\alpha]_D^{22} + 1,23$  (c 1,59, 0,01 M, pH 8, tampón fosfato sódico)

9) Thin layer chromatography (TLC)

La sal sódica del antibiótico PS-5 se somete a TLC bajo las condiciones indicadas. Los valores R<sub>f</sub> se determinan mediante bio-autografía.

(a) Placa TLC de AVICEL/SF celulosa (American Viscose Corp.)

<u>Sistema disolvente</u>	<u>R<sub>f</sub></u>
n-butanol/etanol/agua = 7/7/6 (v/v/v)	0,94
iso-propanol/agua = 7/3 (v/v)	0,96

(b) Placa TLC de gel de sílice (E. Merck, Darmstadt; Placa de gel de sílice pre-revestida 60 F<sub>254</sub>)

<u>Sistema disolvente</u>	<u>Rf</u>
Etanol/agua = 7/3 (v/v)	0,82
n-propanol/agua = 7/3 (v/v)	0,77

10) Cromatografía de papel

5 La sal sódica del antibiótico PS-5 proporciona los siguientes valores Rf sobre papel de filtro Toyo No. 50 (Toyo Roshi Kaisha Ltd.), bajo las condiciones indicadas:

<u>Sistema disolvente</u>	<u>Rf</u>
n-propanol/agua = 7/3 (v/v)	0,68
10 n-propanol/isopropanol/agua = 7/7/6 (v/v/v)	0,70
acetónitrilo/agua = 8/2 (v/v)	0,36
acetónitrilo/tampón tris/EDTA = (véase observación al pie)	0,34
etanol/agua = 7/3 (v/v)	0,63

15 (una mezcla disolvente compuesta de 120 ml de acetónitrilo; 30 ml de tampón de tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico M/10 (pH 7,5) y 1 ml de tetraacetato de etilendiamina M/10 (pH 7,5).

11) Electroforesis de papel a elevada tensión

20 La sal sódica del antibiótico PS-5 se analiza mediante electroforesis de papel a elevada tensión bajo las condiciones indicadas. El aparato es un producto de Savant Instruments Inc. (alta tensión, Modelo No. HV 3000V y electroforesis en placa plana, Modelo No. EP 18A). El papel de filtro empleado para este análisis es papel de filtro Toyo del No. 50.

25 Los resultados obtenidos son los siguientes: Cuando se lleva a cabo la electroforesis durante 30 minutos bajo enfriamiento (inferior a 4°C) a un potencial de 42 V/cm con un tampón (pH 8,6) que contiene 3,3 g de barbital y 25,5 g de barbital sódico en 3.000 ml de agua, el antibiótico PS-5 se mueve a

una distancia de 28 mm del ánodo.

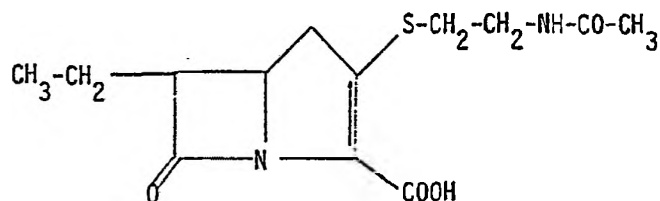
12) Espectro de resonancia magnética  $^{13}\text{C}$

Utilizando dioxano como standard interno, se mide el espectro de resonancia magnética 20 MHz  $^{13}\text{C}$  de la sal sódica del antibiótico PS-5 en agua deuterada, en un espectrómetro Varian CFT-20. Se observaron las siguientes señales características:

5

- (1) 184,04 ppm
- (2) 174,96
- 10 (3) 169,29
- (4) 141,11
- (5) 130,40
- (6) 67,39 (dioxano)
- (7) 60,19
- 15 (8) 55,63
- (9) 40,41
- (10) 40,00
- (11) 31,49
- (12) 22,62
- 20 (13) 22,46
- (14) 11,36

Las propiedades físico-químicas descritas anteriormente demuestran que la estructura molecular del antibiótico PS-5 se puede representar como sigue:



Con el preparado de sal sódica del antibiótico PS-5 de este ejemplo, se confirmaron las siguientes propiedades biológicas:

1) Espectro antimicrobial

5 Se determinan los valores MIC de la sal sódica del antibiótico PS-5 sobre diversos microorganismos patogénicos incluyendo cepas resistentes, mediante el método de dilución de caldo utilizando el caldo de infusión cerebro-corazón "Eiken" (EIKEN CHEMICAL CO., LTD.).

10 La sal sódica del antibiótico PS-5 se disuelve en el caldo de infusión cerebro-corazón "Eiken" (EIKEN CHEMICAL CO., LTD.) (pH 7,0) en una concentración del orden de 5 a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a partir de la cual se efectua una serie de diluciones adecuadas en el mismo medio líquido. Los microorganismos indicados  
15 en la Tabla 8 se cultivan durante 18 horas en el caldo de infusión cerebro-corazón "Eiken" a 28°C y se inocula en la citada serie de dilución del antibiótico PS-5 hasta un tamaño final del inóculo de  $1 \times 10^5$  células/ml. Los cultivos se dejan reposar a 25°C durante 20 horas y a continuación se lee el  
20 crecimiento de los microorganismos para cada dilución del antibiótico PS-5. La concentración inhibidora mínima (MIC) representa la concentración más pequeña del antibiótico PS-5 (sal sódica) en donde no se confirma visualmente la propagación del microorganismo relevante. Como controles, se disuelven  
25 dos antibióticos de  $\beta$ -lactama conocidos, cefaloridina y cefoxitina, en el caldo de infusión cerebro-corazón, a pH 7, en concentraciones que oscilan entre 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y a continuación se diluye para preparar varias series de dilución en el medio líquido antes mencionado. Estas muestras se ensayan  
30 en la forma descrita anteriormente para las determinaciones del valor MIC. La Tabla 8 resume los resultados obtenidos. Además

de los valores MIC del antibiótico PS-5, se incluyen con fines de referencia los valores obtenidos para cefaloridina y cefoxitina.

Tabla 8

Microorganismo	Concentración inhibidora mínima (ug/ml)		
	Antibiótico PS-5	Cefaloridina	Cefoxitina
Staphylococcus aureus FDA 209 P	0,16	0,031	1,25
Smith	0,31	0,031	2,50
Russell	0,31	0,125	2,50
Bx-1633	0,16	0,031	1,25
Diplococcus pneumoniae Type III <sup>4*</sup>	0,02	0,031	1,25
Streptococcus pyogenes NY-5 <sup>4*</sup>	0,08	0,008	0,63
Bacillus subtilis ATCC 6633	0,16	0,031	1,25
Escherichia coli K 12	2,5	2,5	2,5
Alcaligenes faecalis B-326	0,78	6,25	1,56
Citrobacter freundii E-9 <sup>3*</sup>	3,13	>100	>100
Serratia marcescens S-18 <sup>3*</sup>	6,25	>100	50
Klebsiella pneumoniae K-2 <sup>3*</sup>	3,13	6,25	6,25
Enterobacter sp. E-8 <sup>3*</sup>	3,13	3,13	12,5
Enterobacter cloacae E-16 <sup>3*</sup>	12,5	>100	>100
Enterobacter aerogenes E-19 <sup>3*</sup>	6,25	>100	>100
Proteus vulgaris P-5 <sup>3*</sup>	12,5	>100	12,5
Proteus mirabilis P-6 <sup>2*</sup>	6,25	12,5	12,5
Proteus rettgeri P-7	3,13	100	6,25
Proteus sp. P-22	6,25	>100	12,5
Providencia sp. P-8 <sup>2*</sup>	6,25	>100	25,0

Nota: <sup>3\*</sup> Productor de beta-lactamasa;  
<sup>2\*</sup> resistente a canamicina, gentamicina y tobramicina;  
<sup>3\*</sup> resistente a gentamicina y tobramicina  
<sup>4\*</sup> 10% sangre de caballo suplementado en el medio.

2) Potenciación de la actividad antimicrobial de los compuestos de beta-lactama conocidos contra microorganismos resistentes a beta-lactama.

(A) 10 ml de agar nutriente fundido conteniendo 50  $\mu$ g/ml de penicilina G o cefaloridina, 0,8 % de polvo de caldo nutriente Kyokuto y 1% de Difco Bacto-Agar (pH 7,0) se germinan con los  
5 microorganismos productores de beta-lactamasa, resistentes a beta-lactama, indicados en las Tablas 9 y 10, y se vierten en una placa Petri de 9 cm para proporcionar la placa de agar de bioensayo. Sobre esta placa de ensayo, se colocan placas de pulpa de 8 mm conteniendo 25  $\mu$ l cada una de soluciones de anti-  
10 biótico PS-5 a las concentraciones indicadas, y se incuba a 35°C durante 18 horas antes de proceder a la lectura de las zonas de inhibición. La placa de ensayo de control se prepara similarmente sin penicilina G ni cefaloridina. Como antibióticos de referencia se ensayan en la placa, bajo las mismas condiciones, penicilina G, ampicilina, oxacilina y cefazolina.  
15 Las Tablas 9 y 10 resumen los resultados observados.

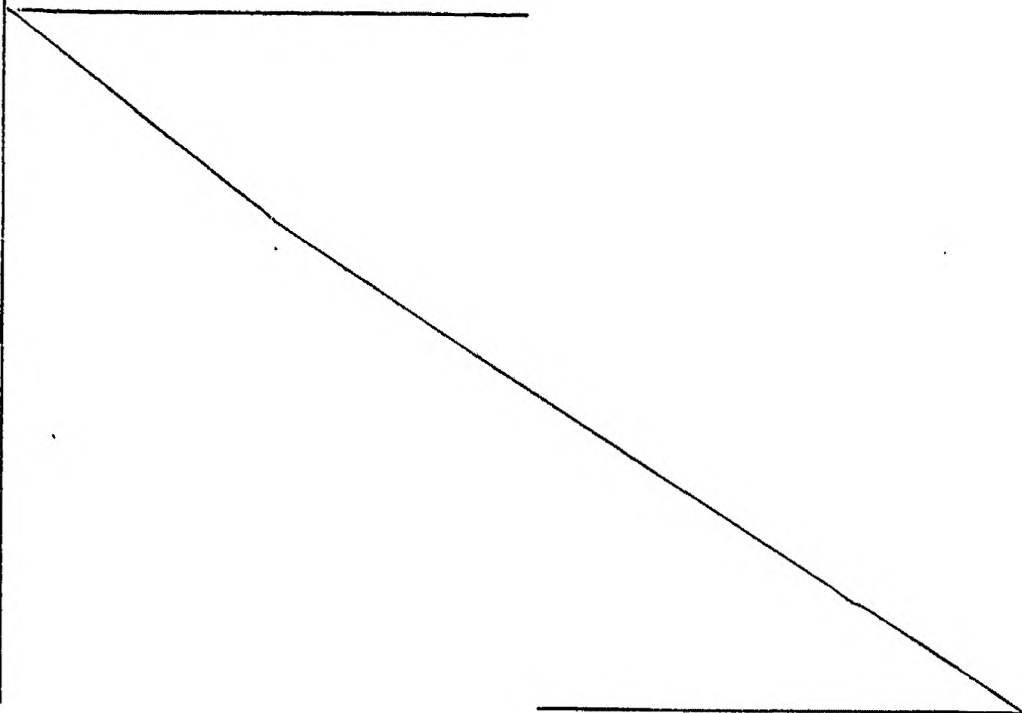


Tabla 9

Microorganismo resistente a beta-lactama	Antibiótico PS-5 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Zona de inhibición (mm)	
		Sin pen. G	Con pen. G
Proteus vulgaris P-5	318	16,0	26,6
	159	14,0	24,5
	100	10,3	22,2
	79,5	0	18,3
Enterobacter sp. E-8	318	20,1	20,0
	159	17,2	17,5
	100	13,8	13,8
	79,5	11,0	11,0
Citrobacter freundii E-9	318	20,8	23,0
	159	17,2	19,2
	100	13,2	15,2
	79,5	10,4	13,1
Serratia marcescens S-18	318	21,3	22,1
	159	17,8	22,0
	100	13,0	16,1
	79,5	0	13,8
Proteus sp. P-22	318	13,6	21,4
	159	11,7	18,2
	100	0	13,8
	79,5	0	12,8

Tabla 10

Zona de inhibición (mm)

<u>Microorganismo resistente a beta-lactama</u>	<u>Antibiótico PS-5 ( µg/ml)</u>	<u>Sin CER*</u>	<u>Con CER*</u>
Enterobacter sp. E-18	318	21,0	21,9
	159	18,2	19,4
	100	16,1	18,0
	79,5	15,1	17,6
Citrobacter freundii E-9	318	22,5	24,6
	159	17,4	22,3
	100	17,4	21,6
	79,5	16,0	19,4
Serratia marcescens	318	21,0	26,1
	159	17,0	24,8
	100	16,8	23,3
	79,5	14,8	22,3
Proteus vulgaris P-5	318	18,5	25,2
	159	15,2	24,0
	100	13,7	22,0
	79,5	12,5	21,8
Proteus vulgaris P-5	<u>Penicilina G ( µg/ml)</u>		
	10.000	14,9	14,5
	2.500	0	0
	625	0	0

Tabla 10 (Continuación)

	Ampicilina ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Proteus vulgaris P-5	10.000	14,7	12,9
	2.500	0	0
	625	0	0

---

	Oxacilina ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Proteus vulgaris P-5	10.000	0	0
	2.500	0	0
	625	0	0

---

	Cefazolin ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Proteus vulgaris P-5	10.000	14,6	12,0
	2.500	0	0
	625	0	0

\* CER = Cefaloridina

- Como será evidente a partir de los resultados anteriores, cuando se combina penicilina G o cefaloridina a una concentración inferior al límite detectable, con el antibiótico PS-5 en una concentración inferior al umbral del ensayo en placa, se observa una zona de inhibición, que significa la potenciación de la actividad de penicilina G y cefaloridina con el antibiótico PS-5. Por el contrario, la penicilina G, ampicilina, oxazilina y cefazolina no pudieron aumentar la actividad antimicrobial de cefaloridina.
- 5
- 10 (B) Se lleva a cabo el siguiente experimento para probar que el efecto potenciante del antibiótico PS-5 es sinérgico.

Sobre una placa de ensayo de agar nutriente germinado mediante una cepa resistente a beta-lactama de *Proteus vulgaris* P-5 (productora de beta-lactamasa), se aplican dos tiras de papel de filtro conteniendo penicilina G o cefaloridina y dos tiras conteniendo antibiótico PS-5, para formar un cuadrado en donde las dos tiras del mismo antibiótico entran en contacto en uno de los vértices. La actividad antimicrobial se lee después de la incubación durante 18 horas a 35°C. Cuando se eligen concentraciones adecuadas de penicilina G ó cefaloridina y de antibiótico PS-5, el área de inhibición se observa solamente en los vértices en donde están presentes el antibiótico PS-5 y la penicilina G o cefaloridina, pero no en los vértices en donde solamente están presentes el antibiótico PS-5, penicilina G o cefaloridina. Este hecho puede explicarse por el sinergismo existente entre el antibiótico PS-5 y la penicilina G o cefaloridina. Es decir, cuando se combinan dos tipos de compuestos a las concentraciones que no son suficientemente bajas para proporcionar una zona de inhibición con un componente solamente, la gran inhibición que así aparece con la combinación se debe al sinergismo.

### 3) Actividad in vivo

La actividad terapéutica de la sal sódica del antibiótico PS-5 se estudia tratando ratones intraperitonealmente infectados con  $5 \times 10^5$  células/ratón de Staphylococcus aureus Smith. Una vez provocada la infección, se inyecta subcutáneamente una solución acuosa de la sal sódica del antibiótico PS-5. En el ratón macho ddy (Shizuoka), la dosis curativa al 50% de este preparado resulta ser de 2,45 mg/kg.

### 4) Toxicidad

Una solución acuosa de la sal sódica del antibió-

tico PS-5 se administra intraperitonealmente a ratones macho DDY (Shizuoka) en la dosis de 500 mg/kg. No se registra muerte alguna.

5) Actividad inhibidora de beta-lactamasa

5 La actividad inhibidora de beta-lactamasa del antibiótico PS-5 se examina tras la hidrólisis de penicilina G por beta-lactamasa de Proteus vulgaris P-5 de las siguientes formas:

(A) Reactivo.

- 10 (1) Sustrato : Sal potásica de penicilina G  
1  $\mu$  mol/ml (= 372,3  $\mu$ g/ml) en 25 mM tampón fosfato (pH 6,8)
- (2) Beta-lactamasa: beta-lactamasa inducible de Proteus vulgaris P-5 que fue purificada mediante cromatografía en columna de CM-celulosa
- 15 (3) Inhibidor: el preparado de sal sódica del antibiótico PS-5  
0,6  $\mu$  mol/ml (= 192  $\mu$ g/ml)
- (4) 25 mM, tampón fosfato pH 6,8.

(B) Composición de reacción y condiciones de ensayo.

20 El sustrato (penicilina G), el inhibidor (antibiótico PS-5) y el tampón se mezclan bien a 30°C en las cantidades indicadas en la siguiente tabla (Tabla 11).

La reacción se inicia en el acto añadiendo las cantidades indicadas de beta-lactamasa a 30°C.

Tabla 11

	(I)	(II)	(III)	(IV)
	Enzima Standard (H)	Enzima Standard(L)	Inhibición por anti- biótico (PS-5)(H)	Inhibición por anti- biótico PS-5(L)
(1) Penicilina G (1 $\mu$ mol/ml)	2,5 moles (2,5 ml)	2,5 moles (2,5 ml)	2,5 moles (2,5 ml)	2,5 moles (2,5 ml)
(2) Antibiótico PS-5 (0,6 $\mu$ mol/ml)	0	0	0,105 moles <sup>**</sup> (0,175 ml)	0,06 moles <sup>***</sup> (0,100 ml)
(3) Tampón fosfato (25 mM, pH 6,8)	(0,5 ml)	(0,5 ml)	(0,325 ml)	(0,40 ml)
(4) Beta-lactamasa	(0,040 ml)	(0,020 ml)	(0,040 ml)	(0,040 ml)

Relación molar del sustrato al inhibidor:

<sup>\*\*</sup> 24 : 1

<sup>\*\*\*</sup> 42 : 1

5 La hidrólisis de penicilina G se traza midiendo la disminución en la densidad óptica a 240 nm, suponiendo que la extinción molar diferencial de penicilina G a 240 nm sea de 556, cuya suposición se derivó de diversos experimentos preliminares.

(C) Resultados

10 La figura 4 muestra el curso de tiempo de la hidrólisis de penicilina G en ausencia del inhibidor (antibiótico PS-5) bajo las condiciones anteriormente citadas. En la figura 4 resul-

ta muy evidente una fuerte inhibición de penicilinas de Proteus vulgaris por el antibiótico PS-5; es decir, cuando están presentes 1/42 equivalentes del antibiótico PS-5 en la penicilina G como sustrato, se inhibe más del 50% de la actividad de beta-lactamasa de Proteus vulgaris P-5.

EJEMPLO 10

METODO PARA LA PREPARACION DEL ESTER DE TRITILLO DEL ANTIBIOTICO

PS-5

En la forma descrita en el ejemplo 4, se tratan 160 litros del filtrado de caldo preparado en la forma descrita en el ejemplo 3, para producir 30 g de polvo liofilizado de color marrón amarillento de la sal sódica del antibiótico PS-5 (actividad específica 27 CCU/mg). Este polvo se disuelve en 100 ml de dimetilformamida y se añaden 3 g de trietilamina. Bajo enfriamiento con hielo, se añaden 9 g de cloruro de tritilo a la mezcla de reacción mientras la temperatura de la solución se mantiene por debajo de 5°C. Después de agitar durante 12 horas a 5°C, se convierte toda la actividad del antibiótico PS-5 al producto de tritilación. La solución de reacción se vierte en 1.000 ml de tampón fosfato 0,5 M (pH 6,8) y se extrae entonces tres veces con 1.000 ml cada vez de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinan, se deshidratan sobre sulfato sódico anhidro y se evaporan hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo de evaporación se disuelve en 20 ml de benceno y se pasa a través de una columna Bio-Beads S-X3 (perlas porosas de copolímero de estireno-divinilbenceno para la permeación de gel, límite de exclusión del peso molecular: 2000, producidas por BIO-RAD Laboratories) (4,5 x 60 cm) que había sido preequilibrada con benceno. La columna se desarrolla con benceno. La fracción activa que muestra una actividad antibiótica en la placa de ensayo

Comamonas, se concentra hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo obtenido se disuelve en 1 ml de benceno y se carga en una columna de gel de sílice (gel de sílice 60; malla 70-230, ASTM; E. Merck, Darmstadt) (25 g; 1,5 x 24,0 cm).  
5 Después de lavar con una mezcla de benceno-acetato de etilo (10:1) para separar los reactivos residuales, la actividad se eluye con una mezcla de benceno-acetato de etilo (1:2). El eluado activo se evapora hasta sequedad bajo presión reducida y se disuelve de nuevo en 0,5 ml de benceno. La solución ben-  
10 cénica se aplica en una columna de óxido de aluminio neutro (óxido de aluminio Woelm neutro; M. Woelm; 20 g, 0,9 x 22,0 cm) y se desarrolla con una mezcla de benceno-acetato de etilo en diversas proporciones de mezcla (10 : 1, 6 : 1, 4 : 1, 3 : 1, 2 : 1 y 1 : 1). Los eluidos activos se combinan y  
15 evaporan hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo de evaporación se disuelve en 0,3 ml de benceno y se carga en una columna de gel de sílice (10 g; 0,9 x 22 cm; como anteriormente se ha descrito). A continuación se eliminan las impurezas con una mezcla de benceno-acetato de etilo (10:1),  
20 se eluye la actividad con una mezcla de benceno-acetato de etilo (1:2) y se concentra a un polvo sólido bajo presión reducida. El polvo obtenido se disuelve en 0,5 ml de benceno y se purifica sobre una columna Bio-Beads S-X3 (1,2 x 96 cm) con benceno como disolvente de desarrollo. El efluente activo se  
25 evapora hasta sequedad in vacuo.

El polvo seco obtenido se disuelve en 0,5 ml de acetona y se somete a filtración de gel en una columna Sephadex LH-20 (un gel de dextrano conformado en perlas, preparado mediante reticulación de las cadenas de dextrano median-  
30 te hidroxipropilación; producido por Pharmacia Fine Chemical AB)

(1,2 x 96 cm), que había sido pre-hinchada en acetona. La fracción activa se evapora hasta sequedad para dar 23 mg de polvo blanco. La recristalización de este polvo en una mezcla de benceno-hexano proporciona 12 mg de polvo cristalino incoloro del producto (10.800 CCU/mg). El polvo cristalino incoloro del producto buscado, es decir el éster de tritilo del antibiótico PS-5 de esta invención, tiene las siguientes propiedades físico-químicas:

1) Color

Incoloro

2) Solubilidad

La solubilidad del producto de tritilación del antibiótico PS-5 se determina disolviendo, bajo agitación, 5 mg de cada uno de los productos de tritilación del antibiótico PS-5 en 0,1 ml de cada uno de los disolventes del ensayo, a 20°C. Los resultados son los siguientes:

Sustancialmente insoluble en agua, n-hexano y éter de petróleo (punto de ebullición 30 - 60°C).

Altamente soluble en benceno, acetato de etilo, cloroformo, metanol, etanol, acetona, dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO).

3) Estabilidad

El éster de tritilo del antibiótico PS-5 se disuelve en un volumen de metanol y a continuación se diluye con 9 volúmenes de agua destilada tan pronto como sea posible, para proporcionar una solución de 125 CCU/ml. Una solución de fosfato dipotásico M/10 se ajusta con ácido fosfórico 5N o hidróxido sódico 5N al pH indicado, en la gama de 3-9. A un mililitro de cada uno de los tampones fosfato, se añade un mililitro de cada una de dichas soluciones del éster de tritilo

5 del antibiótico PS-5, y si es necesario se vuelve a ajustar el valor pH de la mezcla con ácido fosfórico o hidróxido sódico al valor pH deseado. La solución se mantiene en un baño de agua a 60°C durante 30 minutos. Se enfría con agua corriente y se neutraliza a pH 7 con una pequeña cantidad de ácido fosfórico o hidróxido sódico.

10 La solución de control (pH 7) se mantiene en un baño de hielo durante el periodo experimental. La actividad antibiótica residual se ensaya mediante el método de ensayo en placa rutinario con Comamonas terrigena B-996. El porcentaje de actividad de las soluciones tratadas termicamente a la solución de control se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12

pH	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
15 Actividad residual (%)	0	0	6,5	79,0	100	100	100

A partir de estos resultados es evidente que el éster de tritilo del antibiótico PS-5 es estable en una solución acuosa a 60°C durante 30 minutos, a un pH de 6-9.

20 En adición, no se confirma la pérdida sustancial de actividad después de incubar una solución acuosa del producto de tritilación del antibiótico PS-5 a pH 7,5 durante 90 minutos a 60°C.

4) Punto de fusión

25 Se mide en un aparato del punto de microfusión Kofler BY-1 (Yazawa Scientific Mfg. Co., Ltd.), elevándose la

temperatura a una velocidad de 1°C/minuto. El producto de tritilación del antibiótico PS-5 funde a 83,5-85,5°C y vira gradualmente a color marrón por encima de 140°C.

5) Espectro de absorción ultravioleta

5 El espectro de absorción ultravioleta del producto de tritilación del antibiótico PS-5 de la invención, se registra en un espectrofotómetro Hitachi, Modelo EPS-3T (Hitachi, Ltd.) a una concentración de 128 µg/3 ml de metanol (figura 5).

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} = 315,5 \text{ nm} \quad (E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 156)$$

10 6) Espectro de absorción infrarroja

La figura 6 adjunta muestra el espectro de absorción infrarroja del producto de tritilación del antibiótico PS-5 (4,5 mg) en 0,6 ml de cloroformo, registrado en un espectrofotómetro infrarrojo Hitachi, Modelo 215 (Hitachi, Ltd.).  
15 Los máximos de absorción característicos se observan en las siguientes longitudes de onda:

- 3430
- 3100 - 3000 (C-H del grupo fenilo)
- 2990
- 20 2950
- 1770 (C=O del anillo beta-lactama)
- 1695 (-CO- del enlace amida)
- 1665 (-CO-O- del enlace éster)
- 1445
- 25 1340
- 1275
- 1130 cm<sup>-1</sup>

7) Espectro de resonancia magnética protónica

La figura 7 adjunta el espectro de resonancia magnética protónica a 100 MHz del éster de tritilo del antibiótico PS-5, registrado con 4,5 mg del éster de tritilo en 0,3 ml de cloroformo deuterado, utilizando un espectrómetro RMN JEOL JNM PS-100 (Japan Electron Optics Laboratory Co., Ltd.). Las señales más características son las siguientes:

triplete alrededor de 1,10 ppm (J = aprox. 7,0 Hz)

singlete en 1,86 ppm

multiplete en la región de 7,10 - 7,56 ppm

(protones en el anillo benceno del grupo tritilo)

8) Análisis elemental

Se secan 3,5 mg del producto de tritilación del antibiótico PS-5 a temperatura ambiente, durante 4 horas, bajo una presión reducida de  $1 \times 10^{-2}$  mm de Hg y se somete a análisis elemental, para dar los siguientes datos analíticos:

encontrado:

C 61,89 %

H 5,78 %

N 4,48 %

S 4,62 %

9) Reacción de color:

Reactivo Ehrlich : positiva

Cloruro de trifeniltetrazolio : negativa

Cloruro férrico : negativa

Cloruro férrico-yodo : negativa

Iodoplatinato : positiva

Hidroxilamina-cloruro férrico : positiva

Cloro-tolidina : positiva

Ninhidrina : negativa

10) Cromatografía de capa fina (TLC)

El éster de tritilo del antibiótico PS-5 proporciona los siguientes valores R<sub>f</sub> bajo las condiciones indicadas. El punto de emigración se revela mediante bio-autografía sobre Comamonas terrigena B-996.

5

(a) TLC en gel de sílice.

Placa: Placa de gel de sílice pre-revestida 60 F<sub>254</sub>°

E. Merck, Darmstadt.

Sistema disolvente: benceno/acetona (2/1)

10

R<sub>f</sub> : 0,29

(b) TLC en celulosa

Placa: Lámina EASTMAN CHROMAGRAM 13254, celulosa con indicador fluorescente (No. 6065)

Disolvente:

R<sub>f</sub>:

15

Fase superior de n-butanol/etanol/agua (4/1/5) 0,56

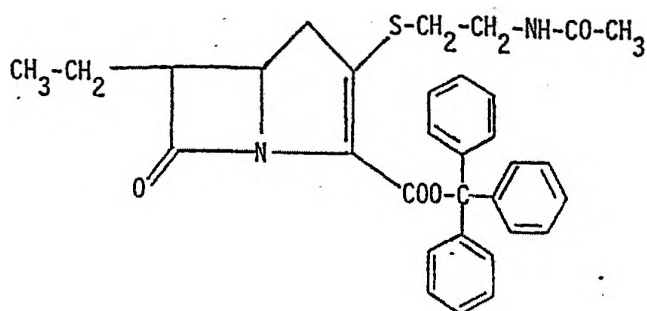
n-butanol 1,0

Isopropanol/agua (8/7) 0,91

Isopropanol/agua (1/4) 1,0

20

La estructura molecular del antibiótico PS-5 y las citadas propiedades físico-químicas soportan la siguiente estructura para el éster de tritilo del antibiótico PS-5.



A continuación se muestran las propiedades biológicas del éster de tritilo del antibiótico PS-5:

1) Espectro antimicrobial:

5 Los valores MIC (concentración inhibidora mínima) del compuesto se determinan sobre diversos microorganismos patogénicos, incluyendo varias cepas resistentes, utilizando el método de dilución de caldo en caldo de infusión cerebro-corazón "Eiken" (EIKEN CHEMICAL CO., LTD.).

10 Más particularmente, el éster de tritilo del antibiótico PS-5 se disuelve en una pequeña cantidad de metanol y se diluye tan pronto como sea posible en caldo de infusión cerebro-corazón "Eiken" (pH 7,0 (EIKEN CHEMICAL CO., LTD.) hasta que la concentración del éster de tritilo del antibiótico PS-5 es del orden de 40 a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La concentración de metanol en la solución final no excede del 10%. Esta solución  
15 se diluye en una serie geométrica de razón 2. Los microorganismos indicados en la Tabla 13 se cultivan durante 18 horas a 28°C en el caldo de infusión cerebro-corazón "Eiken" y se inoculan en la serie de diluciones a un tamaño de inóculo final de  $1 \times 10^5$  células/ml. Los resultados se leen después de incubar a 35°C durante 20 horas. La concentración inhibidora mínima (MIC) significa la unidad de concentración más baja del producto de tritilación del antibiótico PS-5 en la cual no se observó crecimiento alguno del correspondiente microorganismo bajo  
20 las condiciones anteriormente descritas. Como antibióticos de control, se preparan las soluciones de ampicilina y cefaloridina en caldo de infusión cerebro-corazón "Eiken" (pH 7,0) a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se tratan de igual modo que el compuesto de ensayo de la presente invención.

25  
30 La Tabla 13 resume los valores MIC del éster de

tritrilo del antibiótico PS-5 junto con los valores de ampicilina y cefaloridina como antibióticos de control.

Como será evidente a partir de la tabla anteriormente descrita, el éster de tritrilo del antibiótico PS-5 exhibe un amplio espectro antimicrobial y particularmente tiene una fuerte actividad antibiótica sobre diversas cepas de microorganismos resistentes a  $\beta$ -lactama (productoras de  $\beta$ -lactamasa).

Tabla 13

10	Microorganismo	MIC ( $\mu$ g/ml)		
		Tritrilo PS-5	Ampicilina	Cefaloridina
	Staphylococcus aureus FDA 209p	0,17	0,20	0,04
	Staphylococcus aureus Smith	0,27	0,20	0,04
	Diplococcus pneumoniae Tipo III	0,08	0,04	0,01
15	Streptococcus pyogenes NY-5	0,17	0,02	0,01
	Sarcina lutea S-19	0,27	0,05	0,05
	Escherichia coli K12	5,37	3,13	2,5
	Alcaligenes faecalis B-326	1,25	0,25	6,25
	Citrobacter freundii E-9	5,0	>100	>100
20	Serratia marcescens S-18	10,0	50	>100
	Klebsiella pneumoniae K-2	10,7	>100	10,0
	Enterobacter sp. E-8	10,0	>100	>100
	Enterobacter cloacae E-16	10,0	>100	>100
	Enterobacter aerogenes E-19	8,7	>100	>100
25	Proteus vulgaris P-5	21,5	>100	> 20,0
	Proteus mirabilis P-6	21,5	3,13	10,0
	Proteus rettgeri P-7	10,0	50,0	50,0
	Pseudomonas aeruginosa P-1	>43,0	50,0	> 20,0

2) Efecto potenciante del éster de tritrilo del antibiótico PS-5 sobre la actividad antibiótica de compuestos de penicilina y cefalosporina contra microorganismos resistentes:

(A) Se preparan placas Petri de ensayo (9 cm de diámetro) conteniendo microorganismos resistentes, depositando 10 ml del

5 agar nutriente fundido germinado con microorganismos resistentes a  $\beta$ -lactama (productores de  $\beta$ -lactamasa) sobre la capa base s3lida de agar nutriente (pH 7) (15 ml) conteniendo 50  $\mu$ g/ml de penicilina G 6 cefaloridina. Como anteriormente se ha descrito, las soluciones antibi3ticas a ensayar se aplican en una cantidad de 25  $\mu$ l sobre un disco de pulpa de 8 mm y se colocan en las citadas placas de ensayo. Despu3s de incubar durante 18 horas a 35°C, se miden las zonas de inhibici3n y se comparan con los resultados sobre las correspondientes placas de ensayo que no contienen penicilina G ni cefaloridina. La Tabla 14 resume los resultados obtenidos. A partir de los datos de la Tabla 14, resulta evidente que la combinaci3n del producto de tritilaci3n del antibi3tico PS-5 a una concentraci3n por debajo del l3mite inferior del ensayo en placa, con penicilina G o cefaloridina, a una concentraci3n por debajo de dicho l3mite, produce un halo significativo de inhibici3n. Este hecho prueba claramente la potenciaci3n de la actividad antibi3tica de penicilina G 6 cefaloridina con el producto de tritilaci3n del antibi3tico PS-5.

20

Tabla 14

	Halo de inhibici3n (mm)		
	Tritilo PS-5 $\mu$ g/ml	Control	Penicilina G a3adida
Proteus vulgaris P-5	42	0	27,0
		Control	Cefaloridina a3adida
Proteus vulgaris P-5	50	0	15,0
	100	11,0	18,0
Proteus sp. P-22	50	0	11,5
	100	0	13,5
Citrobacter freundii E-9	50	13,0	15,5
	100	16,0	18,0

(B) Según otra prueba de la potenciación, el sinergismo antimicrobial del producto de tritilación del antibiótico PS-5 con cefaloridina, se confirma mediante el método de dilución de caldo sobre una cepa de Proteus vulgaris resistente a -lactama. En primer lugar, se preparan cinco muestras de soluciones madre conteniendo cefaloridina y éster tritílico del antibiótico PS-5 en diversas concentraciones, indicadas en la Tabla 15, utilizando el caldo de infusión cerebro-corazón "Eiken" (pH 7) como disolvente.

Tabla 15.

Solución madre No.	Ester de tritilo del antibiótico PS-5	Cefaloridina
1	100 $\mu\text{g/ml}$	0 $\mu\text{g/ml}$
2	75	500
3	50	1000
4	25	1500
5	0	2000

A partir de cada solución madre, se preparan tres muestras de soluciones sub-madre diluyendo en proporciones de 1:2, 2:5 y 3:10, en el citado caldo de infusión cerebro-corazón. En total, se obtienen quince muestras de soluciones sub-madre. Con cada solución sub-madre, se llevan a cabo 15 etapas de la dilución doble en el caldo de infusión cerebro-corazón. A cada una de las quince diluciones, se inocula Proteus vulgaris P-5 a una concentración final de  $1 \times 10^5$  células/ml y se incuba a  $35^\circ\text{C}$  durante 20 horas. La dilución inhibidora mínima se lee en cada solución madre. Los resultados obtenidos se ofrecen en la Tabla 16.

Tabla 16

Solución madre No.	Tritilo PS-5: cefaloridina	MIC Tritilo PS-5:CER	Cantidad total de los antibióticos
1	100: 0 ( $\mu$ g)	10 + 0 ( $\mu$ g)	10,0 ( $\mu$ g)
2	75:500	3,75: 25	28,75
3	50:1000	1,88+ 37,5	39,38
4	25:1500	1,25+ 75	76,25
5	0:2000	0+1000	1000

Aunque a partir de la Tabla 16 se puede ver claramente el sinergismo, será más fácil de comprobar el efecto sinérgico del éster de tritilo del antibiótico PS-5 sobre la cefaloridina, cuando los resultados MIC se expresan en términos del valor relativo con respecto al valor MIC de cada antibiótico por sí solo. La Tabla 17 demuestra evidentemente el sinergismo existente entre los dos compuestos antibióticos, en donde los valores MIC de cada antibiótico por sí solo se expresan como 100.

Tabla 17

Solución madre No.	Tritilo PS-5 : cefaloridina	Valor MIC relativo (Tritilo PS-5 + CER = Total)
1	100 : 0 ( $\mu$ g)	100 + 0 = 100
2	75 : 500	37,5 + 2,5 = 40
3	50 : 1000	18,8 + 3,75 = 22,55
4	25 : 1500	12,5 + 7,5 = 20
5	0 : 2000	0 + 100 = 100

La Tabla 17 anterior muestra que el efecto sinérgico del éster de tritilo del antibiótico PS-5 sobre cefaloridina es muy evidente. Es decir, cuando Proteus vulgaris P-5 es resistente a los compuestos de  $\beta$ -lactama debido a la producción de  $\beta$ -lactamasa, se emplea como microorganismo de ensayo, la combinación de 7,5 % del MIC de cefaloridina con 12,5% del MIC del éster de tritilo del antibiótico PS-5, inhibe el crecimiento de dicho microorganismo de ensayo.

3) Actividad in vivo:

La actividad in vivo del producto de tritilación del antibiótico PS-5 se mide en ratones intraperitonealmente infectados con  $5 \times 10^3$  células/ratón de Staphylococcus aureus Smith. El éster de tritilo del antibiótico PS-5 se inyecta subcutáneamente justo después de la infección.

La dosis curativa al 50% en ratones DDY machos (SHOZUOKA) es de 2,55 mg/kg (27.540 CCU/kg).

4) Actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasa

(A) Método de ensayo:

Se mide el valor  $I_{50}^{CER}$  de hidrólisis de cefaloridina por  $\beta$ -lactamasa durante 10 minutos (desde 1 minuto a 10 minutos después de iniciarse la incubación). Se mide la velocidad de hidrólisis de cefaloridina por la disminución de la densidad óptica a 225 m $\mu$ . Para los ensayos rutinarios de inhibición, se utiliza  $\beta$ -lactamasa de Citrobacter freundii E-9 y Proteus vulgaris P-5 después de la purificación por cromatografía de afinidad cefalexin-Sepharose 4B.

B) Reactivo: 0,1M tampón fosfato (fosfato Na-K) (pH 6,8)

Sustrato: 0,05 micromoles/ml en tampón fosfato

Beta-lactamasa: La enzima se diluye lo suficiente para dar una caída en la densidad óptica de aproximadamente 0,1 uni-

dades por 10 minutos a 255 m $\mu$  en ausencia de inhibidor.

(Apparatus: Hitachi Spectrophotometer UV-VIS 139, Hitachi, Ltd.)

(Este aparato puede mantener una cubeta de control y tres cubetas de muestra. Se utilizan cuatro cubetas de cuarzo de 1 cm (3 mm en volúmen). La temperatura se mantiene en 30°C durante la reacción).

Inhibidor: La dilución se realiza en tampón fosfato 0,1 M (pH 6,8) o en dimetilsulfóxido (DMSO).

La cubeta de control contiene la misma cantidad de solución de dilución sin inhibidor que la cubeta de muestra.

Condiciones de reacción: La mezcla de enzima-inhibidor de la siguiente composición se preincuba durante 15 minutos a 30°C:

tampón fosfato	100 $\mu$ l
enzima	0,5 - 2,0 $\mu$ l
inhibidor	0,5 - 40 $\mu$ l

Después de la preincubación, la solución de sustrato (precalentada a 30°C, 3 ml) se añade y mezcla rápidamente para iniciar la reacción. La reacción se sigue registrando el cambio en la densidad óptica a 255 m $\mu$  durante 10 minutos a 30°C. El valor de  $I_{50}^{CER}$  ( $\mu$ g/ml) se determina diluyendo el inhibidor hasta que la dilución proporciona un 50% de la velocidad de hidrólisis de cefaloridina registrada en el control sin inhibidor durante 10 minutos (desde 1 minuto a 11 minutos después de la adición del sustrato).

(C) Resultados:

Bajo las condiciones de reacción anteriormente descritas, se obtienen los siguientes valores  $I_{50}^{CER}$  con el éster de tritilo del antibiótico PS-5:

Beta-lactama de :	$I_{50}^{CER}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Proteus vulgaris P-5	0,060
Citrobacter freundii E-9	0,80

5 De este modo, el 50% de la hidrólisis de cefaloridina se inhibe con 0,060  $\mu\text{g/ml}$  y 0,80  $\mu\text{g/ml}$  del producto de tritilación del antibiótico PS-5 en el ensayo mediante  $\beta$ -lactamasas de Proteus vulgaris P-5 y Citrobacter freundii E-9, respectivamente, bajo las condiciones anteriormente especificadas.

10 5) Toxicidad

El éster de tritilo del antibiótico PS-5 no provoca muerte alguna en los ratones ddy machos (Shizuoka) cuando se administra en la dosis intraperitoneal de 500 mg/kg.

EJEMPLO 11

15 METODO PARA LA PREPARACION DEL PRODUCTO DE TRITILACION DEL ANTIBIOTICO PS-5

20 El polvo de color amarillo parduzco de la sal sódica del antibiótico PS-5 (715 mg; 235 CCU/mg) preparado por el mismo método del ejemplo 7, se disuelve en 3,5 ml de hexametilfosfotriamida (HMPA). Después de añadir 70 mg de trietilamina bajo enfriamiento con hielo, se añaden 250 g de bromuro de tritilo a la mezcla a una temperatura inferior a 10°C. La mezcla se agita a 10°C durante 7 horas para completar la reacción de tritilación. La mezcla de reacción se vierte en 25 50 ml de agua de hielo y se deja reposar hasta que funde el hielo sólido.

El éster de tritilo del antibiótico PS-5 se extracta

tres veces con 15 ml cada vez de benceno y se trata en la forma descrita en el ejemplo 10, para dar 9,4 mg de polvo cristalino incoloro del producto deseado. Las propiedades fisico-químicas de este preparado son practicamente idénticas a las obtenidas en el ejemplo 10.

EJEMPLO 12

PREPARACION DEL PRODUCTO DE TRITILACION DEL ANTIBIOTICO PS-5 EN PRESENCIA DE UN ETER CORONA

El polvo de liofilización en bruto, de color blanco parduzco (10,1 g) preparado por el mismo procedimiento que el descrito en el ejemplo 5, se suspende en 200 ml de cloruro de metileno y se disuelve con agitación bajo la adición de 1 ml de 15-corona-5 (Nippon Soda Co.,Ltd). Mientras la temperatura de la solución se mantiene por debajo de 5°C con hielo, se añaden 8,5 g de cloruro de tritilo. La mezcla de reacción se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 3 horas a dicha temperatura. Después de filtrar, el filtrado se evapora hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se disuelve en 10 ml de benceno, se filtra y se purifica por un procedimiento idéntico al descrito en el ejemplo 10, para dar un polvo cristalino incoloro (7,3 mg). Este polvo tiene las mismas propiedades fisico-químicas que las ilustradas en el ejemplo 10.

EJEMPLO 13

METODO PARA LA PREPARACION DEL PRODUCTO DE TRITILACION DEL ANTIBIOTICO PS-5 EN PRESENCIA DE UNA SAL DE AMONIO CUATERNARIO

El antibiótico PS-5 se extracta a partir de 48 litros de filtrado de caldo (11,7 CCU/ml) dos veces con 15 litros cada vez de diclorometano conteniendo 0,05% de cloruro de cetildimetilbencilamonio (actividad del extracto diclorometá-

nico: 24 CCU/ml; actividad de filtrado de caldo agotado: 5,7 CCU/ml).

5 El extracto de diclorometano se seca sobre 400 g de sulfato sódico anhidro y se evapora a 500 ml bajo presión reducida en un evaporador rotativo. El concentrado (450 CCU/ml) se deshidrata preliminarmente sobre 10 g de sulfato sódico anhidro y a continuación, después de filtrar, con 5 g de tamices moleculares 4A (Union Carbide Corp.).

10 A esta solución seca, se añaden 4,5 g de cloruro de tritilo a una temperatura inferior a 5°C y la mezcla se agita durante 5 horas a 5°C. Después de separar el diclorometano por evaporación a temperatura ambiente, el residuo se disuelve en 15 ml de benceno y se purifica de forma similar a la descrita en el ejemplo 10, para dar 8 mg de polvo cristalino  
15 anhidro del éster de tritilo del antibiótico PS-5. Las características físico-químicas de este preparado son casi iguales a las descritas en el ejemplo 10.

#### EJEMPLO 14

##### ESTER DE METILO DEL ANTIBIOTICO PS-5

20 Se suspenden 90 mg de la sal sódica del antibiótico PS-5 obtenida en el ejemplo 9 (8.000 CCU/mg) en 3 ml de dimetilformamida seca, a la cual se añaden 50 mg de trietilamina y 0,3 ml de yoduro de metilo. Después de agitar durante 2 horas y media a temperatura ambiente, se añaden 100 ml de benceno y se mezcla bien para llevar a cabo la extracción. La  
25 capa de benceno se separa, se lava con 100 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 6,8) y se seca entonces sobre sulfato sódico anhidro. La solución de benceno se concentra a un pequeño volumen bajo presión reducida y se aplica a una columna de Bio-Beads S-X3  
30 (BIO-RAD Laboratories) (1,2 x 90 cm).

El éster de metilo se desarrolla con benceno. Las fracciones de eluido conteniendo éster se combinan y evaporan hasta sequedad bajo presión reducida, para dar un aceite incoloro. El material oleoso se disuelve en una pequeña cantidad de acetona y se cromatografía sobre una columna Sephadex LH-20 (1,2 x 90 cm) con acetona como agente de desarrollo. Las fracciones de eluido que contienen al éster de metilo del antibiótico PS-5 se recogen y evaporan hasta sequedad para dar 11,2 mg del éster de metilo del antibiótico PS-5. El éster de metilo exhibe las siguientes propiedades físicas y químicas:

(1) Cromatografía de capa fina

$R_f = 0,45$  (placa de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>: benceno:acetona = 1:1)

(2) Máximo de absorción ultravioleta en metanol

$\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 315,5 \text{ nm}$

(3) Máximo de absorción infrarroja en cloroformo

3430, 1766, 1660  $\text{cm}^{-1}$

(4) Señales en el espectro de resonancia magnética protónica en deuterocloroformo ( $\delta$ )

1,05 (3H, t, J=7,5 Hz)

1,7 - 2,0 (2H, m)

2,00 (3H, s)

2,8 - 3,65 (7H, m)

3,83 (3H, s)

3,84 - 4,06 (1H, m)

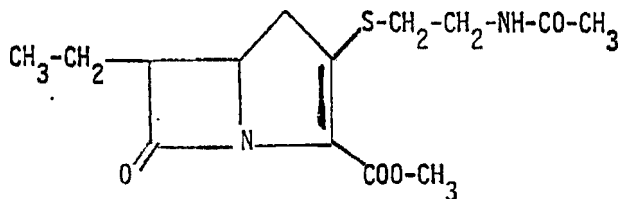
(5) Peso molecular (espectrometría de masa de alta resolución)

312, 1131 (encontrado)

312, 1143: calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ .

Se asigna la siguiente estructura al éster de metilo del antibiótico PS-5 sobre la base de la estructura anteriormente descrita del antibiótico PS-5 y a partir de los anteriores datos físico-químicos:

5



Se repite el procedimiento detallado anteriormente en el ejemplo 14 con yoduro de etilo, yoduro de isopropilo, yoduro de isobutilo, yoduro de n-pentilo o yoduro de n-hexilo, en lugar de yoduro de metilo, para dar, respectivamente, los siguientes ésteres:

10

- éster etílico de antibiótico PS-5
- éster isopropílico de antibiótico PS-5
- éster isobutílico de antibiótico PS-5
- éster n-pentílico de antibiótico PS-5
- éster n-hexílico de antibiótico PS-5

15

La formación de estos ésteres podría confirmarse por cromatografía de capa fina, espectrometría de absorción infrarroja, espectrometría de resonancia magnética protónica y espectrometría de masa.

20

Como anteriormente se ha explicado, la composición conteniendo antibiótico PS-5 y/o éster de tritilo de antibiótico PS-5, se puede administrar en diversas formas de dosifica-

5 ción unitaria tal como en una forma de dosificación, oralmente ingerible, sólida o líquida. La citada composición por unidad de dosificación, tanto sólida como líquida, puede contener una cantidad de material activo del orden de 0,1 a 99%, preferiblemente 10 a 60%. La cantidad de ingrediente activo en la composición puede variar en función de la forma de dosificación y del peso total de la composición y normalmente es del orden de 10 a 1000 mg, con preferencia de 100 a 1000 mg.

10 En la administración parenteral, la unidad de dosificación consistirá normalmente en antibiótico PS-5 puro o altamente purificado, una sal farmacéuticamente aceptable y/o el producto de tritilación del antibiótico PS-5, en solución en agua estéril, o en forma de un polvo soluble proyectado para la solución.

15 Las formulaciones representativas que contienen antibiótico PS-5 y/o su producto de tritilación, se pueden preparar por los siguientes procedimientos:

EJEMPLO A: CAPSULAS

Componente	Por cápsula
Antibiótico PS-5 (sal sódica)	100 mg
Lactosa (J. P.)	cantidad suficiente
Estearato de magnesio	1 mg

25 El compuesto activo y los diluyentes se mezclan bien para producir una mezcla uniforme. Se introducen 200 mg de la mezcla en una cápsula de gelatina dura del No. 3.

EJEMPLO B: TABLETAS

5

Componente	Por tableta
Antibiótico PS-5 (sal sódica)	200 mg
Lactosa (J. P.)	120 mg
Almidón de maíz	175 mg
Estearato de magnesio	5 mg

En la composición anterior, el componente activo se mezcla con lactosa y con una cantidad media de almidón de maíz.

10

La mezcla se granula con 10% de dicha cantidad de pasta de almidón de maíz y se tamiza. Se añade el resto de almidón de maíz y estearato de magnesio y la mezcla se comprime en tabletas, de 1 cm aproximadamente de diámetro, con un peso de 500 mg cada una de ellas.

EJEMPLO C: FORMA LIO PARA INYECCION

15

Componente	Por vial
Antibiótico PS-5 (sal sódica)	25 mg
Agua destilada estéril para inyección (J. P.)	2 ml

20

El componente activo se disuelve en agua estéril para inyección, se filtra y se esteriliza. La solución se subdivide en viales estériles y el agua se elimina asepticamente por liofilización. Los viales conteniendo sólido seco estéril se cierran asepticamente.

Para su preparación en la administración parenteral, se añaden 2 ml de salina fisiológica estéril al contenido de un vial.

EJEMPLO D: TABLETAS

Componente	Por tableta
Antibiótico PS-5 (sal sódica)	20 mg
Cefaloridina	180 mg
Lactosa (J.P.)	120 mg
Almidón de maíz	175 mg
Estearato de magnesio	5 mg
	500 mg

El antibiótico PS-5 y la cefaloridina se mezclan con los otros ingredientes y se procede a la compresión en tabletas, en la forma descrita en el ejemplo B. Las tabletas se recubren primero con un revestimiento de azúcar y a continuación con un revestimiento entérico.

EJEMPLO E: TABLETAS

Componente	Por tableta
Antibiótico PS-5 (sal sódica)	10 mg
Aminobencilpenicilina	190 mg
Lactosa	120 mg
Almidón de maíz	175 mg
Estearato de magnesio	5 mg
	500 mg

Las tabletas que contienen antibiótico PS-5 y aminobencilpenicilina se obtienen por el mismo método que el descrito en el ejemplo B.

EJEMPLO F: CAPSULAS

5

Componente	Por cápsula
Ester de tritilo de antibiótico PS-5	100 mg
Lactosa	Cantidad suficiente
Estearato de magnesio	1 mg

El ingrediente activo y los diluyentes se mezclan bien para dar una mezcla uniforme. Se introducen 200 mg aproximadamente de la mezcla en una cápsula de gelatina dura del No. 3.

10

EJEMPLO G : TABLETAS

15

Componente	Por tableta
Ester de tritilo del antibiótico PS-5	200 mg
Lactosa (J.P.)	120 mg
Almidón de maíz	175 mg
Estearato de magnesio	5 mg
	<hr/> 500 mg <hr/>

20

En el ejemplo anterior, el ingrediente activo se mezcla con lactosa y con la mitad de la cantidad de almidón de maíz en la proporción indicada. La mezcla se granula con 10% de la cantidad indicada de almidón de maíz y se tamiza. Se

5 añade el estearato de magnesio y el resto del almidón de maíz y la mezcla se comprime en tabletas de 1 cm de diámetro, cada una de ellas con un peso de 500 mg. Las tabletas se recubren primero con un revestimiento de azúcar y a continuación con un revestimiento entérico.

EJEMPLO H : FORMA LIO PARA INYECCIÓN

Componente	Por vial
Ester de tritilo del antibiótico PS-5	25 mg
Agua destilada estéril para inyección (J.P.)	2 ml

10 El componente activo se disuelve en agua destilada estéril para inyección y se esteriliza por filtración. La solución se subdivide en viales y se liofiliza asepticamente. Los viales conteniendo al sólido seco estéril se cierran asepticamente.

15 Para la inyección, se añaden 2 ml de N-( $\beta$ -hidroxi-etil)-lactamida al 70% estéril al contenido de un vial.

EJEMPLO I : TABLETAS

Componente	Por tableta
Ester de tritilo del antibiótico PS-5	50 mg
Cefaloridina	150 mg
Lactosa (J.P.)	120 mg
Almidón de maíz	175 mg
Estearato de magnesio	5 mg
	500 mg

El éster de tritilo del antibiótico PS-5 y la cefaloridina se mezclan y a continuación se comprimen para formar tabletas y se revisten, empleando el mismo método que en el ejemplo G.

5	Componente	Por tableta
	Ester de tritilo del antibiótico PS-5	20 mg
	Aminobencilpenicilina	180 mg
	Lactosa (J.P.)	120 mg
	Almidón de maíz	175 mg
10	Estearato de magnesio	5 mg
		500 mg

Los ingredientes activos (éster de tritilo del antibiótico PS-5 y aminobencilpenicilina) se mezclan y se procesan por un método idéntico al descrito en el ejemplo I.

15 Descripción de los dibujos:

La figura 1 es el espectro de absorción ultravioleta de la sal sódica del antibiótico PS-5 preparada en el ejemplo 9 de esta invención.

20 La figura 2 es el espectro de absorción infrarroja de la sal sódica del antibiótico PS-5.

La figura 3 es el espectro de resonancia magnética protónica de la sal sódica del antibiótico PS-5.

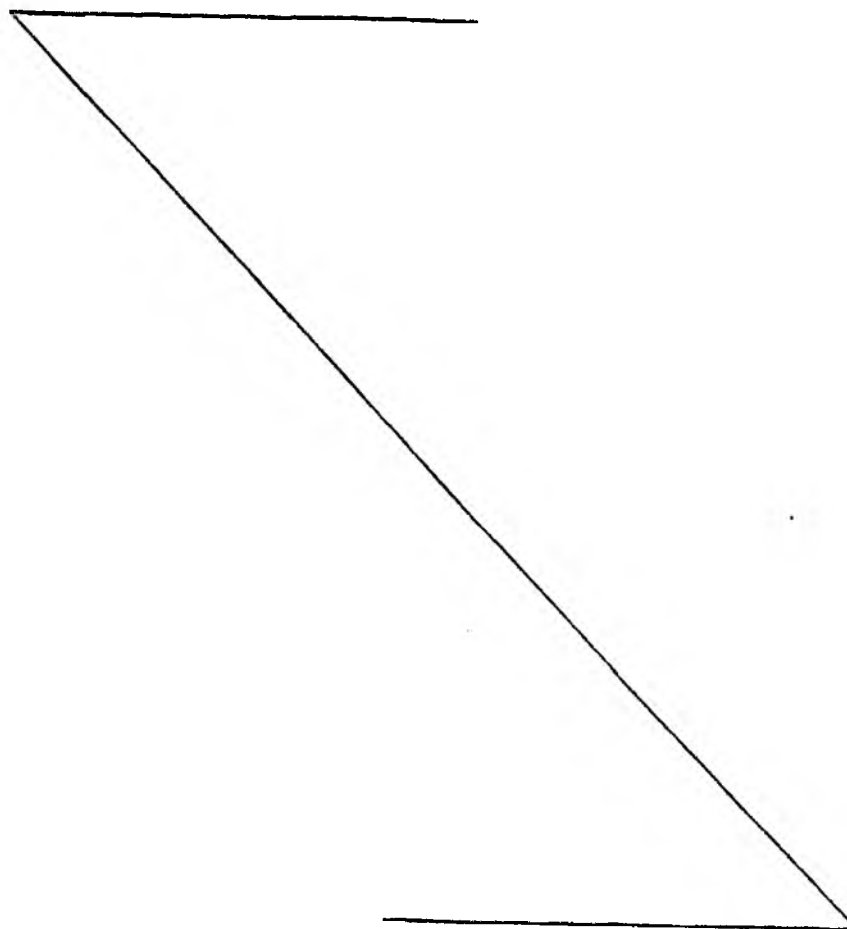
25 La figura 4 ilustra el curso de la degradación de penicilina G por  $\beta$ -lactamasa de Proteus vulgaris P-5, para demostrar la actividad inhibidora del antibiótico PS-5 preparado en el ejemplo 9 de esta invención.

La figura 5 es el espectro de absorción ultravioleta del éster de tritilo del antibiótico PS-5 preparado en el ejemplo 10 de esta invención.

5 La figura 6 es el espectro de absorción infrarroja de dicho éster de tritilo del antibiótico PS-5.

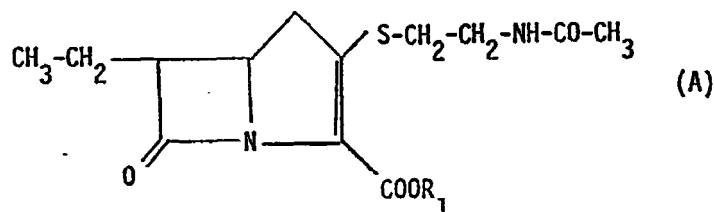
La figura 7 es el espectro de resonancia magnética protónica de dicho éster de tritilo del antibiótico PS-5.

10 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.



REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para preparar un nuevo antibiótico con actividad inhibidora de beta-lactamasa, de fórmula general:



10

15

en la que R<sub>1</sub> representa hidrógeno, alquilo inferior y trifenilmetilo y cuando R<sub>1</sub> es hidrógeno las sales de dichos compuestos; caracterizado porque comprende cultivar aerobicamente, en un medio nutriente, un microorganismo capaz de producir la actividad antibiótica del compuesto de fórmula A en donde R<sub>1</sub> es hidrógeno; aislar dicha actividad de los materiales cultivados; y opcionalmente convertir el compuesto de fórmula A en donde R<sub>1</sub> es hidrógeno o sus sales a un compuesto de fórmula A en donde R<sub>1</sub> es alquilo inferior o trifenilmetilo mediante reacción con un diazoalcano inferior o con un compuesto de fórmula RY en donde R es alquilo inferior o trifenilmetilo e Y es un átomo o un grupo que puede disociarse fácilmente.

20

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la cepa microbial se elige entre Streptomyces A271 y sus mutantes naturales y artificiales capaces de producir dicha actividad antibiótica.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la cepa microbial es Streptomyces A271.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fermentación se efectúa a una temperatura entre 20 y 40°C, a un pH entre 4 y 9 y durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 90 horas.

5  
5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el aislamiento del producto de fermentación antibiologicamente activo se efectúa según cualquiera de los métodos normalmente empleados para recuperar antibióticos del tipo ácido carboxílico de sus materiales de fermentación.

10  
6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la actividad antibiótica se aísla como la sal sódica del compuesto de fórmula A en donde  $R_1$  es hidrógeno.

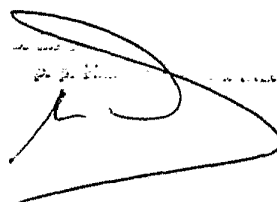
15  
7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la actividad antibiótica en donde  $R_1$  es hidrógeno o una sal de la misma se transforma en el compuesto de fórmula A en donde  $R_1$  es alquilo inferior o tritilo por reacción en un compuesto de fórmula RY en donde R es alquilo inferior o trifluorometilo e Y es un átomo o un grupo que se puede disociar fácilmente.

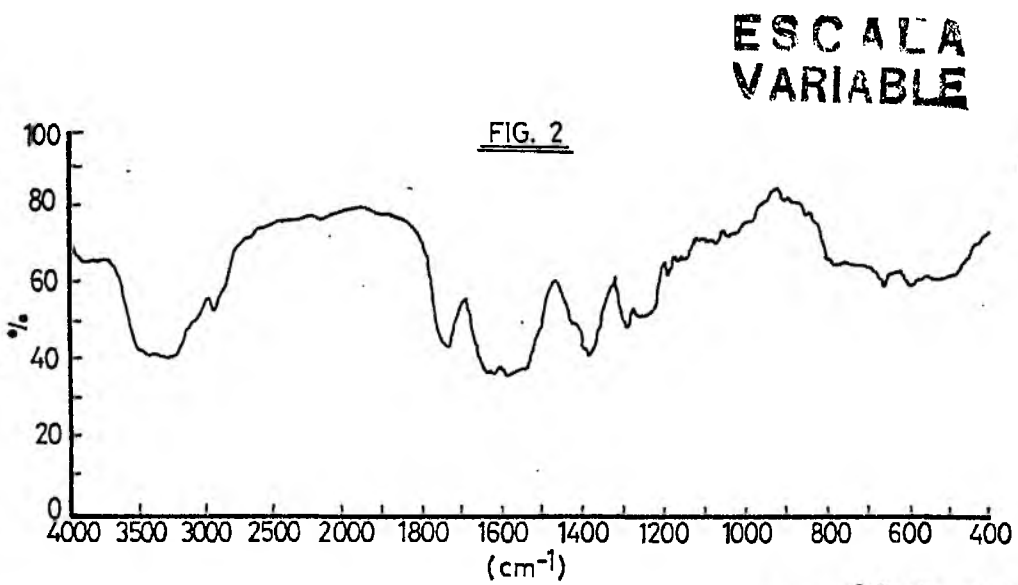
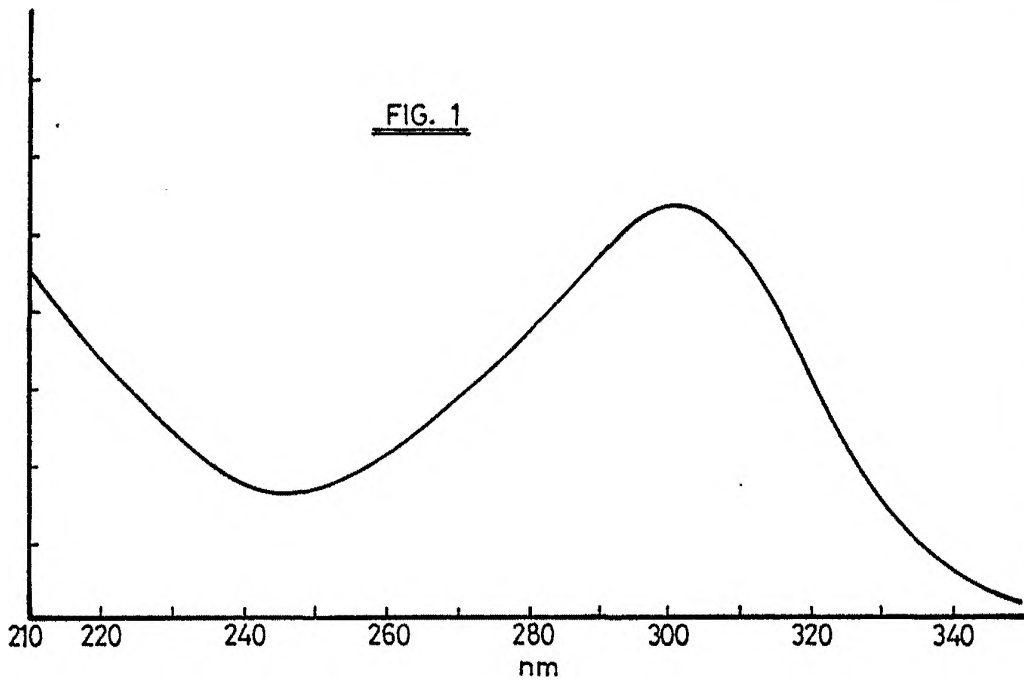
20  
8.- Procedimiento para preparar un nuevo antibiótico con actividad inhibidora de beta-lactamasa, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjuntos.

Esta Memoria consta de 97 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14 FEB. 1979

SANRAKU-OCEAN Co. LTD y  
PANLABS, Inc.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'S' followed by a horizontal line and a vertical stroke.



Madrid 12 JUN 1978  
A. P. Brandolet  
Dir.

