



ESPAÑA

19 ES	11 21	NUMERO 471.709	10 AT
	22	FECHA DE PRESENTACION 13.7.78	

PATENTE DE INVENCION

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

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO 815.329 841.242	13.7.77 11.10.77	U.S.A. "

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D; A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION UN PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO PARA LA PREPARACION DE UN NUEVO COMPLEJO ANTIBIOTICO.
--

71 SOLICITANTE (S) BRISTOL-MYERS COMPANY.
--

DOMICILIO DEL SOLICITANTE 345 Park Avenue, NEW YORK 10022 - ESTADOS UNIDOS -

72 INVENTOR (ES) Koji Tomita; Hiroshi Tsukiura e Hiroshi Kawaguchi,
--

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU
--

POOR
QUALITY

1 RESUMEN DE LA INVENCION

5 Un nuevo complejo antibiótico denominado aquí Bu-2313 se produce por fermentación de Micropolispora esp. ATCC 31295, 31296, 31297 y 31298. El complejo se separa en dos componentes bioactivos, Bu-2313A y Bu-2313B; que están estructuralmente relacionados con el grupo de antibióticos de estreptolidigin-tirandamicina. Son activos contra las bacterias anaerobias.

10 COMPENDIO DE LA INVENCION

15 Esta invención se refiere a nuevas sustancias antibióticas. Más especialmente, se refiere a un complejo antibiótico denominado aquí Bu-2313, siendo producido dicho complejo por cultivo de una cepa de Micropolispora caesia con las características identificadoras del ATCC nº 31295, 31296, 31297 y 31298 bajo condiciones aerobias conocidas, en un medio acuoso hasta que se produce en el medio de cultivo una cantidad sustancial de Bu-2313 y, opcionalmente, recuperando el Bu-2313 del medio de cultivo.

20 Esta invención también proporciona dos nuevos componentes antibióticos de Bu-2313, denominados Bu-2313A y Bu-2313B, que se recuperan del complejo de Bu-2313 por procedimientos cromatográficos. El Bu-2313 y sus componentes bioactivos Bu-2313A y Bu-2313B presentan actividad antibacteriana contra diversas bacterias anaerobias y algunas bacterias aerobias. El Bu-2313A y el Bu-2313B son útiles en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en los animales, incluido el hombre, especialmente en las enfermedades causadas por bacterias anaerobias.

25

30

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el espectro de absorción ultravioleta de Bu-2313A en etanol, en NaOH N/10-5 % etanol, en tampón de fosfato a pH 7,0 y en HCl N/10-5 % etanol.

La Figura 2 muestra el espectro de absorción ultravioleta de Bu-2313B en etanol, en NaOH N/10-5 % etanol, en tampón de fosfato a pH 7,0 y en HCl N/10-5 % etanol.

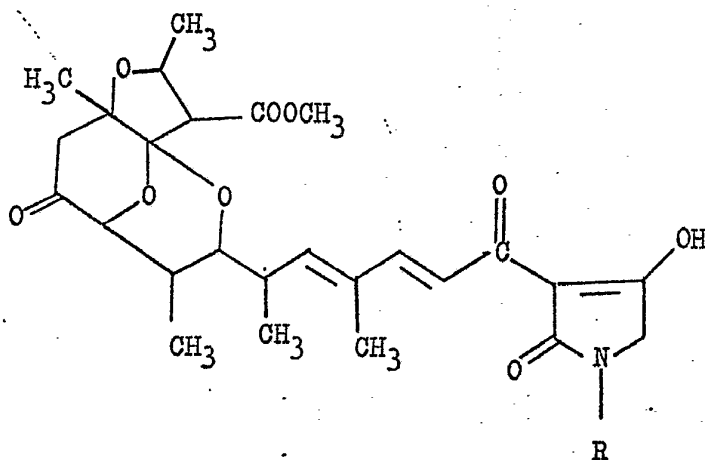
La Figura 3 muestra el espectro de absorción infrarrojo del Bu-2313A cuando se forma una pastilla con bromuro potásico.

La Figura 4 muestra el espectro de absorción infrarrojo del Bu-2313B cuando se forma una pastilla con bromuro potásico.

La Figura 5 muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de Bu-2313A en $CDCl_3$ (60 MHz).

La Figura 6 muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de Bu-2313B en $CDCl_3$ (60 MHz).

Los compuestos Bu-2313 y sus componentes Bu-2313A y Bu-2313B pueden ser producidos por fermentación de ciertas nuevas subespecies cromógenas de Micropolyspora caesia. Las estructuras de Bu-2313A y Bu-2313B son las siguientes:



1 Bu-2313A R = CH₃

Bu-2313B R = H

El Microorganismo

5 En el curso de una selección de antibióticos anti-
anaerobios, se aisló una cepa de actinomiceto oligospórica
nº E864-61 de una muestra de tierra recogida en el distrito de
Rajasthan, India. Se aisló a 42^oC en una placa de agar de
medio de extracto-peptona-sales inorgánicas suplementado con
2 mcg/ml de dihidroximetilfuratrizina y 40 mcg/ml de nista-
10 tina. Se halló que la cepa E864-61 producía un nuevo comple-
jo antibiótico Bu-2313, que es activo fundamentalmente con-
tra diversas bacterias anaerobias.

Morfología

15 La cepa E864-61 forma esporas sobre los micelios aéreos
y del substrato. La mayoría de las esporas son individuales
y se encuentran directamente sobre las hifas o sobre esporófe-
ros cortos. Ocasionalmente se observan esporas apareadas y
cadenas de 2 a 8 esporas. El color del micelio aéreo es blan-
co, volviéndose más tarde de color verde azulado mate o verde
20 grisáceo pálido con abundante esporulación. En el medio de
agar se producen dos tipos de pigmento, violeta y verde os-
curo. Las esporas son de forma esférica a oval, de un tamaño
de 0,5-0,7 por 0,5-1,2 micras y su superficie es lisa. Las
25 hifas aéreas ocasionalmente se retuercen en varias vueltas,
que pueden llegar hasta diez, con el aspecto de una cadena
de esporas recta. Generalmente no se observa fragmentación
del micelio del substrato, mientras que una variante sin mi-
celio aéreo forma celdas fragmentadas después de un largo pe-
30 riodo de incubación. La cepa madre (S-2) es susceptible de

1 formar variantes espontáneas que difieren en su capacidad
de formación de una masa verdosa de esporas, el micelio aé-
reo o el pigmento violeta o verde. Las propiedades de la
5 cepa original y de algunas variantes se encuentran en la Ta-
bla I.

TABLA I

Cepa número	Masa ver- dosa de es- poras	Micelio aéreo	Producción de pigmento		Relación de Bu-2313A/Bu- 2313B produ- cida
			Violeta	verde	
10 S-2 (cepa original)	+	+	+	+	8 : 2
S-26 (va- riante)	+	+	-	-	1 : 9
S-7 (va- riante)	-	+	+	-	6 : 4
15 Y-29 (va- riante)	-	-	-	+	1 : 9

La variante Y-29, producida a partir de la cepa origi-
nal S-2 por técnicas de aislamiento de monoesporas, es selec-
cionada como cepa muy productora. Se han depositado cultivos
de actinomiceto E864-61 cepas S-2, S-26, S-7 e Y-29 en la
20 American Type Culture Collection, Washington, D.C. y se han
incorporado a su colección permanente de microorganismos como
ATCC números 31295, 31297, 31296 y 31298, respectivamente.

Composición de la pared celular

La cepa E864-61 contiene meso-DAP, galactosa y ramnosa
25 como componentes de diagnóstico de la pared celular. La com-
posición de la pared celular se encuentra en la Tabla II.

1

TABLA II

Composición de aminoácidos e hidratos de carbono de la pared celular

5

<u>Aminoácido</u>	<u>Cepa E864-61</u>
meso-DAP	+++
LL-DAP	-
Glicina	-
Acido glutámico	+++
Alanina	+++
<u>Hidratos de carbono</u>	
Arabinosa	-
Galactosa	+++
Ramnosa	+
Manosa	trazas

10

15

Características de cultivo

La cepa E864-61 crece vigorosamente sobre medios nutritivamente ricos tales como agar extracto de levadura-extracto de malta y agar de Bennett, mientras que el crecimiento es pobre en medios químicamente definidos tales como agar almidón-sal mineral, agar glucosa-asparagina, agar tirosina y agar glucosa-sales amónicas. No experimenta ningún crecimiento sobre agar Czapek.

20

25

La cepa original de E864-61 (S-2) forma esporas y micelio aéreo abundantes. Produce dos tipos de pigmento: un pigmento púrpura rojizo a marrón rojizo sobre agar extracto de levadura-extracto de malta, agar peptona-extracto de levadura-hierro y agar glucosa-sales amónicas y un pigmento verde oscuro sobre agar harina de avena, agar tirosina y agar de Bennett. La variante nº S-26 esporula bien y forma micelio aéreo pero carece de capacidad de formación de pigmento.

30

1 La variante nº S-7 forma un micelio aéreo blanco
sin masa de esporas verdosa y produce abundante pigmento púr-
pura rojizo pero no produce el pigmento verdoso. La variante
5 nº Y-29 carece de capacidad de formación de masas de esporas
y de micelio aéreo y por lo tanto presenta un aspecto simi-
lar al de una bacteria. Produce solamente un pigmento verdo-
so pero esta propiedad es perdida fácilmente por transferen-
cia. Las características de cultivo de la cepa original y de
10 las variantes espontáneas se encuentran en la Tabla III.

10

15

20

25

30

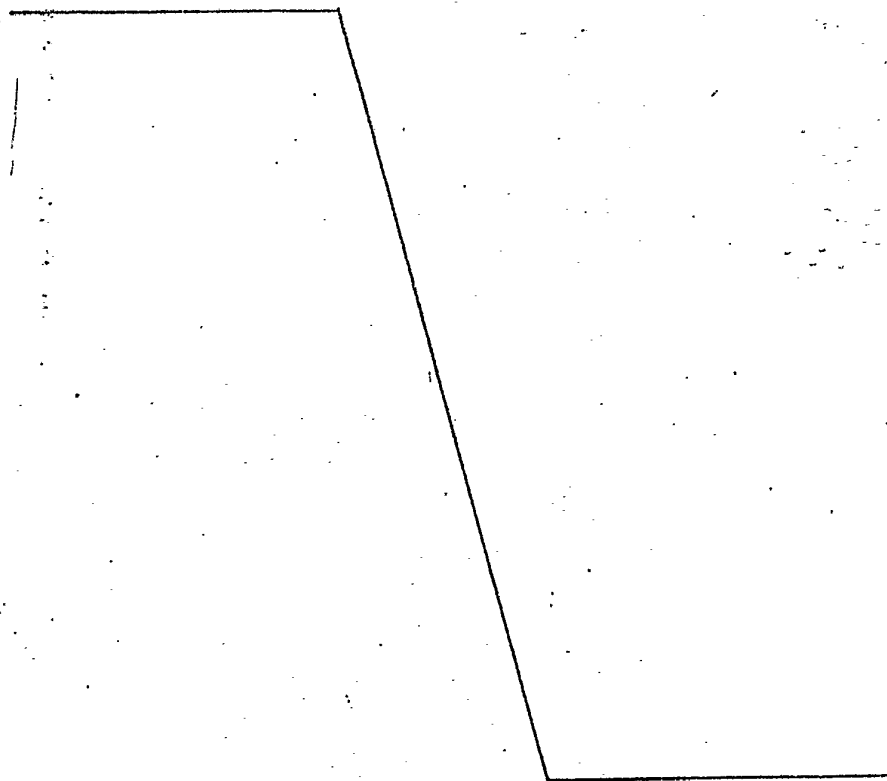


TABELA III

Características de cultivo de la cepa E864-61 y de sus variantes

	Cepa E864-61 nº S-2	Variante nº S-7	Variante nº Y-29
1. Agar sacarosa-nitratada (agar de Czapek)	G. VM no hay crecimiento	no hay crecimiento o crecimiento de color oscuro Moderado, Blanco.	No hay crecimiento
	AM	Ninguno	
	D	Grecimiento moderado. Marrón amarillento.	Crecimiento moderado. Verde oro u oliva
2. Agar extracto de levadura-extracto de malta (ISP nº 2)	G. VM Abundante. Verde azulado mate	Abundante. Amarillo mate y verde grisáceo pálido	Ninguno
	AM	Marrón rojizo pálido	
	D	Grecimiento moderado. Marrón amarillento.	Crecimiento moderado. Verde oro u oliva
3. Agar harina de avena (ISP nº 3)	G. VM Abundante. Verde azulado mate	Abundante. Amarillo mate y verde grisáceo pálido	Ninguno
	AM	Marrón rojizo pálido	
	D	Grecimiento moderado. Marrón amarillento.	Crecimiento escaso. Amarillo mate
4. Agar almidón-sales minerales (ISP nº 4)	G. VM Abundante. Verde azulado mate	Abundante. Amarillo mate y verde grisáceo pálido	Ninguno
	AM	Marrón rojizo pálido	
	D	Grecimiento moderado. Marrón amarillento.	Crecimiento escaso. Amarillo mate
5. Agar glucosa-asparagina (ISP nº 5)	G. VM Abundante. Verde azulado mate	Abundante. Amarillo mate y verde grisáceo pálido	Ninguno
	AM	Marrón rojizo pálido	
	D	Grecimiento moderado. Marrón amarillento.	Crecimiento escaso. Amarillo mate
6. Agar pepton-extracto de levadura-hierro (ISP nº 6)	G. VM Abundante. Verde azulado mate	Abundante. Amarillo mate y verde grisáceo pálido	Ninguno
	AM	Marrón rojizo pálido	
	D	Grecimiento moderado. Marrón amarillento.	Crecimiento escaso. Amarillo mate

TABLA III

Características de cultivo de la cepa E864-61

1

5

10

15

20

25

30

		<u>Cepa E864-61 nº S-2</u>	<u>Variante nº S-26</u>	<u>Var</u>
1. Agar sacarosa-nitro (agar de Gzapek)	C. VM	no hay crecimiento	no hay crecimiento	no o c lon Mod
	AM			Nir
	D			
2. Agar extracto de levadura-extracto de malta (ISP nº 2)	C. VM	Crecimiento moderado. Marrón rojizo	Crecimiento moderado. Marrón amarillento	Cre do. so
	AM	Abundante. Verde azulado mate	Abundante. Amarillo mate a verde grisáceo pálido	Ni Bl
	D	Marrón rojizo pálido	Marrón rojizo pálido	Na te
3. Agar harina de avena (ISP nº 3)	C. VM	Crecimiento moderado. Verde oscuro	Crecimiento moderado. Marrón pálido	Cr do ma
	AM	Abundante. Verde azulado mate	Escaso. Blanco y verde grisáceo pálido	Ni Bl
	D	Marrón rojizo pálido	Ninguno	Pa t
4. Agar almidón-sales minerales (ISP nº 4)	C. VM	Crecimiento escaso	Crecimiento escaso	C M P N c E
	AM			
	D			
5. Agar glucosa-aspargina (ISP nº 5)	C. VM	Crecimiento escaso	Crecimiento escaso	C I
	AM		Escaso. Blanco	I
	D		Ninguno	
6. Agar peptona-extracto de levadura-hierro (ISP nº 6)	C. VM	Crecimiento pobre	Crecimiento pobre. Incoloro	
	AM	Ninguno	Ninguno	
	D	Púrpura rojizo mate	Ninguno	

TABLA III

Características de cultivo de la cepa E864-61 y de sus variantes

	<u>Cepa E864-61 nº S-2</u>	<u>Variante nº S-26</u>	<u>Variante nº S-7</u>	<u>Variante nº Y-29</u>
1. VM	no hay crecimiento	no hay crecimiento	no hay crecimiento o crecimiento de colonias. Rosa oscuro Moderado. Blanco.	No hay crecimiento
AM				
D			Ninguno	
2. VM	Crecimiento moderado. Marrón rojizo	Crecimiento moderado. Marrón amarillento.	Crecimiento moderado. Naranja intenso.	Crecimiento moderado. Verde oro u oliva
AM	Abundante. Verde azulado mate	Abundante. Amarillo mate a verde grisáceo pálido	Ninguno o escaso. Blanco	Ninguno
D	Marrón rojizo pálido	Marrón rojizo pálido	Naranja rojizo intenso	Dorado u oliva
3. VM	Crecimiento moderado. Verde oscuro	Crecimiento moderado. Marrón pálido	Crecimiento moderado. Púrpura rojizo mate	Crecimiento escaso. Amarillo mate
AM	Abundante. Verde azulado mate	Escaso. Blanco y verde grisáceo pálido	Ninguno o escaso. Blanco	Ninguno
D	Marrón rojizo pálido	Ninguno	Púrpura rojizo mate	Ninguno
4. VM	Crecimiento escaso	Crecimiento escaso	Crecimiento escaso. Marrón amarillento pálido	Crecimiento escaso. Incoloro
AM			Nulo o escaso. Blanco	Ninguno
D			Rosa púrpura pálido	Ninguno
5. VM	Crecimiento escaso	Crecimiento escaso	Crecimiento escaso. Naranja	Crecimiento pobre. Blanquecino
AM		Escaso. Blanco	Ninguno	Ninguno
D		Ninguno	Ninguno	Ninguno
6. VM	Crecimiento pobre	Crecimiento pobre. Incoloro	Crecimiento restringido. Incoloro	Crecimiento pobre. Blanquecino
AM	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
D	Púrpura rojizo mate	Ninguno	Ninguno	Ninguno

TABLA III (Cont.)

		Ceja ES64-61nS-2	Variante nº S-25	Variante nº S-7	Variante nº Y-29
7. Agar tirosina (ISP nº 7)	C. VM	Crecimiento res- tringido. Verde oliva	Crecimiento pobre. Rosa amarillento pálido	Crecimiento pobre. Marrón amarillento pálido	Crecimiento pobre. Dorado
	AM	Abundante. Verde azulado pálido	Escaso. Blanco	Escaso. Amarillo pálido	Ninguno
	D	Ninguno	Ninguno	Púrpura rojizo mate pálido	Ninguno
8. Agar glucosa- sales amónicas	C. VM	Crecimiento pobre, marrón amarillento pálido a marrón ro- jizo pálido	Crecimiento escaso. Marrón pálido	Crecimiento escaso. Marrón amarillento pálido	Crecimiento esca- so. Marrón dorado y marrón amarillen- to.
	AM	Escaso. Blanco	Escaso. Blanco	Ninguno	Ninguno
	D	Ninguno	Ninguno	Púrpura rojizo in- tensp	Ninguno
9. Agar de Bennett	C. VM	Crecimiento modera- do. Verde oscuro	Crecimiento pobre. Incoloro	Crecimiento modera- do. Naranja intenso	Crecimiento pobre. Blanquecino
	AM	Abundante. Verde grisáceo pálido	Escaso. Blanco o ver- de grisáceo pálido	Ninguno	Ninguno
	D	Oliva	Ninguno	Rosa grisáceo	Ninguno

1

5

10

15

20

25

30

TABLA III (Cont.)

1

Cepa E864-61 nº S-2

Variante nº S-25

7. Agar tirosina
(ISP nº 7)

C. VM

Crecimiento res-
tringido. Verde
oliva

Crecimiento pobre.
Rosa amarillento
pálido

5

AM

Abundante. Verde
azulado pálido

Escaso. Blanco

D

Ninguno

Ninguno

8. Agar glucosa-
sales amónicas

C. VM

Crecimiento pobre,
marrón amarillento
pálido a marrón ro-
jizo pálido

Crecimiento escaso.
Marrón pálido

10

AM

Escaso. Blanco

Escaso. Blanco

D

Ninguno

Ninguno

9. Agar de Bennett

C. VM

Crecimiento modera-
do. Verde oscuro

Crecimiento pobre.
Incoloro

AM

Abundante. Verde
grisáceo pálido

Escaso. Blanco o ver-
de grisáceo pálido

15

D

Oliva

Ninguno

20

25

30

TABLA III (Cont.)

	<u>Cepa E864-61nº S-2</u>	<u>Variante nº S-25</u>	<u>Variante nº S-7</u>	<u>Variante nº Y-29</u>
VM	Crecimiento restringido. Verde oliva	Crecimiento pobre. Rosa amarillento pálido	Crecimiento pobre. Marrón amarillento pálido	Crecimiento pobre. Dorado
AM	Abundante. Verde azulado pálido	Escaso. Blanco	Escaso. Amarillo pálido	Ninguno
D	Ninguno	Ninguno	Púrpura rojizo mate	Ninguno
VM	Crecimiento pobre, marrón amarillento pálido a marrón rojizo pálido	Crecimiento escaso. Marrón pálido	Crecimiento escaso. Marrón amarillento pálido	Crecimiento escaso. Marrón dorado y marrón amarillento.
AM	Escaso. Blanco	Escaso. Blanco	Ninguno	Ninguno
D	Ninguno	Ninguno	Púrpura rojizo intenso	Ninguno
VM	Crecimiento moderado. Verde oscuro	Crecimiento pobre. Incoloro	Crecimiento moderado. Naranja intenso	Crecimiento pobre. Blanquecino
AM	Abundante. Verde grisáceo pálido	Escaso. Blanco o verde grisáceo pálido	Ninguno	Ninguno
D	Oliva	Ninguno	Rosa grisáceo	Ninguno

1 Características fisiológicas

5 La cepa E864-61 es un actinomiceto aerobio y mesofílico. La temperatura óptima de crecimiento para la cepa oscila entre 32° y 42°C y se obtiene un crecimiento moderado a 20° y 48°C. No se observa crecimiento a 55°C. Las reacciones fisiológicas y las utilizaciones de hidratos de carbono de las cepas original y variantes se encuentran en las Tablas IV y V respectivamente.

10 TABLA IV

Reacciones fisiológicas

Ensayo	Respuesta			Método y medio
	S-2	S-26	Y-29	
Nitritos a partir de nitratos en medio inorgánico	-	+	-	Caldo de Czapek de sacarosa-nitrato
15 Nitritos a partir de nitratos en medio orgánico	-	-	-	0,5% extracto de levadura, 1,0% glucosa, 0,5% KNO ₃ , 0,1% CaCO ₃
Tolerancia al cloruro sódico	Sustancialmente moderado a una concentración de 4% o menos de NaCl. No hay crecimiento al 5% de NaCl			Medio basal: 1% extracto de levadura, 2% almidón soluble, 1,5% agar
20 Hidrólisis de la caseína en medio de agar	++	++	-	Medio de agar de Luedemann
Reacciones en solución de leche descremada				
25 Coagulación:	++	-	+	
Peptonización:	+	-	-	
Licuefacción de la gelatina	++	+	-	1,0% extracto de malta, 0,4% extracto de levadura, 0,4% glucosa, 16% gelatina.

TABLA IV (Cont.)

	Ensayo	Respuesta			Método y medio
		S-2	S-26	Y-29	
5	Producción de H ₂ S a partir de L-cisteína	++	++	++	L-cisteína (0,1%) agregada a caldo de triptona-extracto de levadura (medio ISP nº 1) más agar. H ₂ S detectado por una tira de papel que contenía solución acuosa al 10% de acetato de plomo
10	Hidrólisis de la tirosina	+	+	+	Se omitió la L-asparagina del agar de tirosina.
	Formación de melanoide	-	-	-	Agar tirosina y agar peptona-levadura-hierro.
15	Catalasa	++	++	++	Crecimiento de una noche sobre agar nutriente. Solución de peróxido de hidrógeno.
	Oxidasa	-	-	-	Crecimiento de una noche sobre agar nutriente. Reactivo de Kovac.
20	Efecto de la temperatura	Crecimiento máximo a 32-42°C. Crecimiento moderado a 20°C y 48°C. Nulo crecimiento a 55°C			Extracto de levadura-extracto de malta.
25					
30					

TABLA V

Utilización de hidratos de carbono de la ceña E864-61

		<u>Cepa original</u>		<u>Variantes números</u>		
		<u>Nº S-2</u>	<u>S-26</u>	<u>S-7</u>	<u>Y-29</u>	
5	1. Glicerol	+	+	+	+	
	2. D(-)-arabinosa	+	+	±	+	
	3. L(+)-arabinosa	+	+	+	+	
	4. D-xilosa	+	+	+	+	
	5. D-ribosa	+	+	+	+	
	6. L-ramnosa	+	+	-	+	
10	7. D-glucosa (control positivo)	+	+	+	+	
	8. D-galactosa	+	+	+	+	
	9. D-fructosa	+	+	+	+	
	10. D-manosa	+	+	+	+	
15	11. L(-)-sorbosa	-	-	-	-	
	12. Sacarosa	-	-	-	-	
	13. Lactosa	+	+	+	-	
	14. Celobiosa	+	+	+	+	
	15. Melibiosa	+	+	+	+	
20	16. Trehalosa	±	±	+	+	
	17. Rafinosa	-	-	-	-	
	18. D(+)-melezitosa	-	-	-	-	
	19. Almidón soluble	+	+	+	+	
	20. Dulcitol	-	-	-	-	
	21. Inositol	-	-	±	+	
25	22. D-manitol	+	+	+	+	
	23. D-sorbitol	-	-	-	-	
	24. Salicina	±	-	-	-	
	25. Celulosa	-	-	-	-	
	Medio basal: Medio basal de Luedemann					
30	Condiciones de cultivo: 37°C, 2 semanas.					

1 Taxonomía

5 Las características morfológicas y de composición de la pared celular de la cepa E864-61 indican que el organismo debe ser clasificado en la familia Micromonosporaceae Krasilnikov 1938, descrita en el Manual of Determinative Bacteriology de Bergey, 8ª edición, 1975. Cuando se compara con el género de las Micromonosporaceae, la cepa E864-61 es diferente del género Micromonospora en su formación de micelio aéreo y en la composición de su pared celular del Tipo IV aunque hay presente ramosa en lugar de arabinosa. También difiere de los géneros Thermoactinomyces, Actinobifida, Thermomonospora, Microbispora y Microtetraspera en la morfología de las esporas y en el tipo de pared celular (Tipo III para estos géneros). El más relacionado con la cepa E864-61, en el tipo de pared celular, morfología de las esporas y modo de esporulación, es el género Micropolyspora. Se han descrito ocho especies bajo el género Micropolyspora y se observa una diversidad considerable entre las especies en el número de esporas en una cadena. Se ha informado que Micropolyspora caesia contiene de 1 a 5 esporas y tres especies de 5 a 20 esporas en una cadena. La cepa E864-61 es similar a la Micropolyspora caesia Kalakoutskii 1964 en que forma predominantemente esporas individuales y ocasionalmente cadenas de 2-8 esporas. Además, la cepa se parece a M. caesia en el color de su micelio aéreo, en el intervalo de temperaturas de crecimiento y en el tipo de pared celular, aunque difiere de esta última en la producción de dos clases de pigmento difusible. Así, la cepa E864-61 se considera una nueva subespecie cromógena de Micropolyspora

10

15

20

25

30

1 caesia.

5 Como la cepa E864-61 es fácilmente mutable natural o artificialmente, debe entenderse que esta invención no se limita a la cepa original S-2 o a las variantes S-26, S-7 ó Y-29. Se pretende específicamente incluir todos los mutantes y variantes naturales y artificiales productores de Bu-2313 que puedan obtenerse a partir de los organismos descritos por medios tales como radiación X, radiación ultravioleta, tratamiento con mostazas nitrogenadas, exposición a fagos y similares. Como en el caso de otros antibióticos, se prevé que puede conseguirse una mayor producción de Bu-2313 mediante la selección de cepas altamente productoras después de la selección de una sola colonia, por tratamiento con diversos mutágenos o mediante los procedimientos genéticos de recombinación, transformación o transducción.

15 Preparación del antibiótico

20 El complejo antibiótico Bu-2313 es producido cultivando una cepa de Micropolyspora caesia E864-61 (y preferiblemente ATCC nº 31295, 31296, 31297 y 31298), en condiciones aerobias sumergidas, en un medio nutritivo acuoso. Los procedimientos generales utilizados para el cultivo de otros actinomicetos son aplicables al cultivo de Micropolyspora caesia E864-61. El medio nutritivo debe contener una o más fuentes de carbono asimilable como glicerol, glucosa, fructosa, manosa, almidón, dextrina, maltosa, melazas, aceites, grasas y similares, en estado purificado o crudo. El medio nutritivo también debe contener una o más fuentes de nitrógeno asimilable como, por ejemplo, harina de soja, harina de pescado, extracto de malta, peptona, extracto de levadura, solubles de destilería, harina de gluten, licor de

25

30

1 infusión de maíz, harina de semilla de algodón, caseína,
sustancias proteicas hidrolizadas, nitratos, sales amóni-
cas, urea y similares. También pueden agregarse al medio
5 sales inorgánicas nutrientes como cloruro sódico, sulfato
potásico, sulfato magnésico, carbonato cálcico y cantidades
traza de sales de metales pesados como cobre, cinc, manga-
neso, hierro y similares. En el cultivo sumergido aireado,
puede utilizarse un antiespumante como parafina líquida,
aceite de soja, grasa o silicona.

10 Preferiblemente, la temperatura de fermentación debe
estar comprendida entre alrededor de 20°C y 48°C y los lí-
mites más preferidos son de 32 a 42°C. El pH del medio de
fermentación debe estar comprendido aproximadamente entre
5 y 10 y el intervalo preferido es alrededor de 6 a 8. Nor-
15 malmente, se obtiene la producción óptima en 3 a 7 días.
Cuando se realiza la fermentación en tanque, es conveniente
producir un inóculo vegetativo en un caldo nutritivo por
inoculación del caldo de cultivo con un cultivo en tubo in-
clinado o en tierra o con un cultivo liofilizado del orga-
20 nismo. Después de obtener de esta forma un inóculo activo,
se transfiere asépticamente al medio del tanque de fermen-
tación. La actividad antibiótica en el caldo de fermenta-
ción puede ser determinada mediante un análisis en disco de
papel-placa de agar utilizando Bacteroides fragilis como
25 organismo de ensayo cultivado sobre GAM (medio anaerobio
Gifu, Nissui) en condiciones anaerobias. Después de que se
ha obtenido la potencia óptima del caldo, este último se
filtra, preferiblemente con un auxiliar de filtración. La
torta micelial se lava con agua y el filtrado combinado
30 con las aguas de lavado se ajusta a pH 8 aproximadamente

1 y se pasa por una columna de una resina polimérica macro-
reticular (macroporosa) no iónica, tal como Diaion HP-20
(Mitsubishi Chemical Industries) o Amberlite XAD-2 (Rohm
and Haas, Co.). La columna de resina se lava con agua y me-
5 tanol acuoso (v.g. metanol al 40 %) y después se eluye con
metanol acuoso al 95 % aproximadamente. Se combinan las
fracciones activas, se concentran a vacío, y se evaporan o
liofilizan para obtener el complejo crudo Bu-2313. El sólido
10 crudo así obtenido puede ser separado en sus componen-
tes, Bu-2313A y Bu-2313B, por cromatografía sobre una resi-
na macrorreticular como se ha indicado antes y/o por cromatografía en gel de sílice.

15 Cuando se fermentan algunas cepas de Micropolyspora
caesia E864-61, se ha encontrado que la adición de glicina
al medio de fermentación (v.g. 1 %) reprime la producción
de Bu-2313A y da como producto principal Bu-2313B.

Propiedades físicoquímicas de Bu-2313A y Bu-2313B

20 El Bu-2313A y el Bu-2313B son ambas sustancias ácidas
aisladas como cristales de color amarillo pálido. Son fácil-
mente solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos
como alcoholes inferiores, acetato de etilo, cloroformo y
benceno; ligeramente solubles en hexano y agua alcalina pe-
ro prácticamente insolubles en agua. Son estables en solu-
25 ción ácida pero menos en solución alcalina, siendo inacti-
vados a la temperatura ambiente cuando se mantienen durante
la noche en una solución de NaOH N/10. Ambos componentes
dan reacción positiva con cloruro férrico pero reacción ne-
gativa en ninhidrina, antrona y reacción de Sakaguchi y de
30 Tollen. El Bu-2313A y Bu-2313B pueden ser diferenciados me-
diante dos sistemas de cromatografía en capa fina indica-

1 dos a continuación:

Componente	Rf	
	Sistema 1 [†]	Sistema 2 ^{††}
Bu-2313A	0,31	0,39
5 Bu-2313B	0,05	0,30

† Gel de sílice, cloroformo-metanol (100:3)

†† Gel de sílice, benceno-metanol (4:1).

10 El compuesto bu-2313A funde a 116-118°C y es ópticamente activo: $[\alpha]_D^{26} = -58^\circ$ (c = 0,5, metanol). Presenta un pKa' de 5,2 en solución acuosa de etanol al 50 %, con un equivalente de valoración de 519 y su espectro de masas da un pico de ión molecular a m/e 517. El compuesto Bu-2313B funde a 160-162°C y es ópticamente activo: $[\alpha]_D^{25} = -69,9^\circ$ (c = 0,3, metanol) y $-34,9^\circ$ (c = 0,93, CHCl₃). Presenta un valor de pKa' de 4,9 en solución acuosa de etanol al 46 %, con un equivalente de valoración de 509 y da un pico de ión molecular a m/e 503 en el espectro de masas.

20 Los espectros ultravioleta de Bu-2313A y Bu-2313B en diversos disolventes se encuentran en las Figs. 1 y 2, respectivamente, y los máximos de absorción están indicados a continuación:

Disolvente	Bu-2313A: λ_{\max} en nm ($E_1^{1\%}$ cm)
25 Etanol	235(330), 288(290), 344(535), 355(555).
NaOH N/10 - 5% etanol	257(400), 293(415), 337(520).
Tampón de fosfato a pH 7,0	261(418), 291(430), 339(482).
30 HCl N/10 - 5% etanol	241(310), 361(690), 373(670).

1 tálidos, v.g. cationes de metales alcalinos o alcalino-té-
rreos como sodio, potasio, calcio y magnesio.

Propiedades biológicas de Bu-2313A y de Bu-2313B

Espectro antibacteriano

5 La concentración mínima de inhibición (CMI) de Bu-2313A
y de Bu-2313B se determinaron mediante el método de dilu-
ción seriada al doble en agar, utilizando un aparato multi-
inoculante, frente a una variedad de bacterias aerobias y
anaerobias. Generalmente se utilizó medio de agar nutriente
10 (Eiken) para las bacterias aerobias, medio de Gonococcus
(GC) (Eiken) para los organismos aerobios molestos como
estreptococos, Neisseria y Hemophilus, y medio de agar GAM
(Nissui) para las bacterias anaerobias.

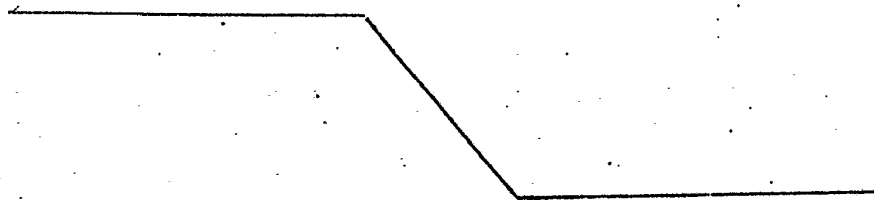
15 Las actividades in vitro de Bu-2313A y Bu-2313B contra
diversos organismos aerobios y anaerobios se encuentran en
las Tablas VI y VII, respectivamente, junto con las de la
tirandamicina y la clindamicina que se utilizaron como
compuestos de referencia. Las sustancias Bu-2313A y Bu-2313B
20 inhiben el crecimiento de diversas bacterias anaerobias a
concentraciones bajas pero presentan sólo una actividad de
débil a moderada contra muchos de los organismos aerobios
hábituales como S. aureus, E. coli y K. pneumoniae. Sin em-
bargo, las cepas de las especies Bacillus, estreptococcus,
Neisseria meningitidis, N. gonorrhoeae y Hemophilus influen-
25 zae son susceptibles en las sustancias Bu-2313A y Bu-2313B.
En general, la actividad y el espectro antibacteriano de
Bu-2313A y Bu-2313B son muy similares a las de la tiranda-
micina y la actividad intrínseca in vitro de Bu-2313B pare-
ce ser algo mayor que la del Bu-2313A.

1 Efecto del tamaño de inóculo

La influencia del tamaño de inóculo sobre la CMI fue determinada para dos organismos anaerobios (B. fragilis y C. perfringens) utilizando caldo GAM en medio de agar. Como muestra la Tabla VIII, los valores de la CMI de Bu-2313A y Bu-2313B fueron considerablemente afectados por el tamaño de inóculo cuando se determinaron por el método de dilución en caldo.

5 Actividad bactericida

10 El potencial bactericida de los compuestos Bu-2313A y Bu-2313B fue determinado en dos organismos anaerobios y uno aerobio. Se realizaron recuentos de las células viables formando una placa de una parte alícuota de 0,1 ml. de caldo de cada tubo exento de turbidez, después de la determinación de la CMI. Se utilizaron placas de agar GAM para el recuento de células viables de B. fragilis y C. perfringens y agar nutriente conteniendo 5 % de suero de caballo para S. pyogenes, y las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C. La concentración de antibiótico que permite un crecimiento inferior a 100 colonias por placa se definió como bactericida (tamaño del inóculo original: 10⁵-10⁶ células/ml). Como muestra la Tabla IX, la acción antibacteriana de las sustancias Bu-2313A y Bu-2313B parece ser bacteriostática más que bactericida.



1

TABLA VI

Actividad in vitro contra bacterias aerobias

Número de clave	Organismo experimental	Medio de ensayo	GMI (mcg/ml)			
			Bu-2313A	Bu-2313B	Tirandamicina	Clindamicina
Ec-3	<u>Escherichia coli</u> Juhl A15119	A	>100	>100	>100	12,5
Ec-8	<u>Escherichia coli</u> K-12 A9632	A	>100	>100	>100	25
Kp-2	<u>Klebsiella pneumoniae</u> A9678	A	>100	>100	>100	100
Sm-1	<u>Serratia marcescens</u> A20019	A	>100	>100	>100	50
Pa-13	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> A9843	A	>100	>100	>100	>100
Pm-1	<u>Proteus mirabilis</u> A9554	A	>100	>100	>100	100
Pg-1	<u>Proteus morgani</u> A9553	A	>100	>100	>100	100
Sa-1	<u>Staphylococcus aureus</u> 209P	A	25	25...	100	0,1
Sa-2	<u>Staphylococcus aureus</u> Smith	A	12,5	12,5	>100	0,1
Sa-8	<u>Staphylococcus aureus</u> n° 52-34	A	12,5	12,5	50	0,1
Sl-1	<u>Sarcina lutea</u> PCI-1001	A	25	12,5	50	0,025
Mf-1	<u>Micrococcus flavus</u>	A	6,3	25	25	0,0125
Bc-1	<u>Bacillus cereus</u> ATCC 10702 A	A	0,8	0,8	0,4	0,4
Bs-1	<u>Bacillus subtilis</u> PCI-219	A	1,6	1,6	3,1	0,8
Sp-3	<u>Streptococcus pyogenes</u> A9604	B	0,8	0,4	0,8	0,0125
Sp-9	<u>Streptococcus pyogenes</u> A20201	B	0,8	0,4	0,8	0,0125
Sv-8	<u>Streptococcus viridans</u> A21354	B	0,8	0,4	0,4	0,025
Dp-4	<u>Diplococcus pneumoniae</u> A9585	B	0,8	0,4	0,4	0,0125
Nm-2	<u>Neisseria meningitidis</u> A20049	B	1,6	0,8	0,8	0,05
Nm-4	<u>Neisseria meningitidis</u> A21496	B	3,1	1,6	0,8	0,025
Ng-1	<u>Neisseria gonorrhoeae</u> A15112	B	1,6	0,8	0,4	0,2
Ng-4	<u>Neisseria gonorrhoeae</u> A20154	B	0,8	0,8	0,4	0,2
Hi-3	<u>Haemophilus influenzae</u> A9832	B	0,8	0,4	0,4	0,4
Hi-7	<u>Haemophilus influenzae</u> A20188	B	1,6	0,8	0,8	0,8

A: Agar nutriente (Eiken)

B: Medio GC (Eiken)

5

10

15

20

25

30

TABLA VI

Actividad in vitro contra bacterias aerobias

1

5

10

15

20

25

30

Número de clave	Organismo experimental	Medio de ensayo *	Bu-2313A
Ec-3	<u>Escherichia coli</u> Juhl A15119	A	>100
Ec-8	<u>Escherichia coli</u> K-12 A9632	A	>100
Kp-2	<u>Klebsiella pneumoniae</u> A9678	A	>100
Sm-1	<u>Serratia marcescens</u> A20019	A	>100
Pa-13	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> A9843	A	>100
Pm-1	<u>Proteus mirabilis</u> A9554	A	>100
Pg-1	<u>Proteus morgani</u> A9553	A	>100
Sa-1	<u>Staphylococcus aureus</u> 209P	A	25
Sa-2	<u>Staphylococcus aureus</u> Smith	A	12,5
Sa-8	<u>Staphylococcus aureus</u> nº 52-34	A	12,5
Sl-1	<u>Sarcina lutea</u> PCI-1001	A	25
Mf-1	<u>Micrococcus flavus</u>	A	6,3
Bc-1	<u>Bacillus cereus</u> ATCC 10702 A	A	0,8
Bs-1	<u>Bacillus subtilis</u> PCI-219	A	1,6
Sp-3	<u>Streptococcus pyogenes</u> A9604	B	0,8
Sp-9	<u>Streptococcus pyogenes</u> A20201	B	0,8
Sv-8	<u>Streptococcus viridans</u> A21354	B	0,8
Dp-4	<u>Diplococcus pneumoniae</u> A9585	B	0,8
Nm-2	<u>Neisseria meningitidis</u> A20049	B	1,6
Nm-4	<u>Neisseria meningitidis</u> A21496	B	3,1
Ng-1	<u>Neisseria gonorrhoeae</u> A15112	B	1,6
Ng-4	<u>Neisseria gonorrhoeae</u> A20154	B	0,8
Hi-3	<u>Hemophilus influenzae</u> A9832	B	0,8
Hi-7	<u>Hemophilus influenzae</u> A20188	B	1,6

A: Agar nutriente (Eiken)

B: Medio GC (Eiken)

TABLA VI

Actividad in vitro contra bacterias aerobias

organismo experimental	Medio de ensayo *	CMI (mcg/ml)			
		Bu-2313A	Bu-2313B	Tirandamicina	Clindamicina
<u>coli</u> Juhl A15119	A	>100	>100	>100	12,5
<u>coli</u> K-12 A9632	A	>100	>100	>100	25
<u>neumoniae</u> A9678	A	>100	>100	>100	100
<u>cescens</u> A20019	A	>100	>100	>100	50
<u>aeruginosa</u> A9843	A	>100	>100	>100	>100
<u>bilis</u> A9554	A	>100	>100	>100	100
<u>anii</u> A9553	A	>100	>100	>100	100
<u>us aureus</u> 209P	A	25	25	100	0,1
<u>us aureus</u> Smith	A	12,5	12,5	>100	0,1
<u>us aureus</u> nº 52-34	A	12,5	12,5	50	0,1
<u>a</u> PCI-1001	A	25	12,5	50	0,025
<u>flavus</u>	A	6,3	25	25	0,0125
<u>us</u> ATCC 10702 A	A	0,8	0,8	0,4	0,4
<u>tilis</u> PCI-219	A	1,6	1,6	3,1	0,8
<u>us pyogenes</u> A9604	B	0,8	0,4	0,8	0,0125
<u>us pyogenes</u> A20201	B	0,8	0,4	0,8	0,0125
<u>us viridans</u> A21354	B	0,8	0,4	0,4	0,025
<u>pneumoniae</u> A9585	B	0,8	0,4	0,4	0,0125
<u>eningitidis</u> A20049	B	1,6	0,8	0,8	0,05
<u>eningitidis</u> A21496	B	3,1	1,6	0,8	0,025
<u>onorrhoeae</u> A15112	B	1,6	0,8	0,4	0,2
<u>onorrhoeae</u> A20154	B	0,8	0,8	0,4	0,2
<u>influenzae</u> A9832	B	0,8	0,4	0,4	0,4
<u>influenzae</u> A20188	B	1,6	0,8	0,8	0,8

iken)

B: Medio GC (Eiken)

TABLA VII

Actividad in vitro contra bacterias anaerobias

Número de clave	Organismo experimental	CMI (mcg/ml)		
		Bu-2-13A	Bu-2313B	Clindamicina
Bf-1	<u>Bacteroides fragilis</u> A20926	0,2	0,1	0,05
Bf-3	<u>Bacteroides fragilis</u> A20928-1	0,1	0,1	0,05
Bf-4	<u>Bacteroides fragilis</u> A20929	0,2	0,2	0,05
Bf-6	<u>Bacteroides fragilis</u> A20930	0,2	0,1	0,05
Bf-7	<u>Bacteroides fragilis</u> A20932	0,2	0,1	0,05
Bf-10	<u>Bacteroides fragilis</u> A20935	0,2	0,1	0,025
Sm-1	<u>Sphaerophorus necrophorus</u> A15202	0,2	0,1	0,025
So-1	<u>Sphaerophorus pseudonecrophorus</u> A20013	0,2	0,1	0,05
FO-1	<u>Fusobacterium mortiferum</u> ATCC 9817	0,2	0,1	0,05
FV-1	<u>Fusobacterium varium</u> ATCC 8501	0,1	0,1	0,05
Ae-1	<u>Acidoaminococcus fermentans</u> ATCC 25085	0,2	0,1	0,05
Vp-1	<u>Veillonella parvula</u> ATCC 17745	0,2	0,1	0,05
Cb-1	<u>Clostridium acetobutylicum</u> IAM 19011	0,4	0,2	0,1
Ce-1	<u>Clostridium gabroicum</u> IAM 19228	0,4	0,2	0,1
Ch-1	<u>Clostridium chavoei</u> A9561	0,2	0,2	0,025
Cp-1	<u>Clostridium perfringens</u> A9635	0,4	0,2	0,025
Cp-2	<u>Clostridium perfringens</u> A21284	0,4	0,2	0,025
Pp-1	<u>Peptococcus prevotii</u> ATCC 9321	0,2	0,1	0,1
Pe-101	<u>Peptococcus aerogenes</u> ATCC 14963	0,2	0,2	0,2
Pb-1	<u>Pentostreptococcus anaerobius</u> B43	0,4	0,4	0,8

TABLA VII

Actividad in vitro contra bacterias anaerobias

<u>nismo experimental</u>	<u>CMI (mcg/ml)</u>			
	<u>Bu-2313A</u>	<u>Bu-2313B</u>	<u>Tirandamicina</u>	<u>Clindamicina</u>
<u>fragilis</u> A20926	0,2	0,1	0,2	0,05
<u>fragilis</u> A20928-1	0,1	0,1	0,1	0,05
<u>fragilis</u> A20929	0,2	0,1	0,2	0,05
<u>fragilis</u> A20930	0,2	0,1	0,1	0,05
<u>fragilis</u> A20932	0,2	0,1	0,1	0,05
<u>fragilis</u> A20935	0,2	0,1	0,1	0,025
<u>s necrophorus</u> A15202	0,2	0,1	0,1	0,025
<u>s pseudonecrophorus</u> A20013	0,2	0,1	0,2	0,05
<u>a mortiferum</u> ATCC 9817	0,2	0,1	0,1	0,05
<u>n varium</u> ATCC 8501	0,1	0,1	0,1	0,05
<u>occus fermentans</u> ATCC 25085	0,2	0,1	0,1	0,05
<u>parvula</u> ATCC 17745	0,2	0,1	0,1	0,05
<u>acetobutylicum</u> IAM 19011	0,4	0,2	0,2	0,1
<u>caproicum</u> IAM 19228	0,4	0,2	0,2	0,1
<u>shavoei</u> A9561	0,2	0,2	0,2	0,025
<u>erfringens</u> A9635	0,4	0,2	0,1	0,025
<u>perfringens</u> A21284	0,4	0,2	0,1	0,025
<u>prevotii</u> ATCC 9321	0,2	0,1	0,2	0,1
<u>aerogenes</u> ATCC 14963	0,2	0,2	0,1	0,2
<u>occus anaerobius</u> B43	0,4	0,4	0,2	0,8

TABLA VIII

Efecto del tamaño del inóculo

Tamaño del inóculo, células/ml	CMI (mcg/ml) en agar GAM		Clindamicina
	Bu-2313A	Bu-2313B	
<i>B. fragilis</i> A20928-1	0,1	0,05	0,025
	0,1	0,2	0,025
<i>G. perfringens</i> A9635	0,1	0,8	0,0125
	0,1	0,8	0,0125

Tamaño del inóculo, células/ml	CMI (mcg/ml) en caldo GAM		Clindamicina
	Bu-2313A	Bu-2313B	
<i>B. fragilis</i> A20928-1	0,006	0,013	0,025
	0,8	0,4	0,05
<i>G. perfringens</i> A9635	0,1	0,1	0,025
	100	25	12,5

TABLA IX

Actividad bactericida

Tamaño del inóculo, células/ml	CMI y CMB (mcg/ml)		Clindamicina
	Bu-2313A	Bu-2313B	
<i>B. fragilis</i> A20928-1	0,03 > 0,8	0,006 > 0,8	0,05
	0,1	12,5	0,05
<i>G. perfringens</i> A9635	0,4	12,5	0,025
	0,4	12,5	0,025

TABLA VIII

Efecto del tamaño del inócul

1

5

10

15

20

25

30

	Tamaño del inóculo, células/ml	CMI (mcg/ml) en aga		
		Bu-2313A	Bu-2313B	Tir
<u>B. fragilis</u> A20928-1	1,2 x 10 ⁶	0,1	0,05	
	1,2 x 10 ⁷	0,1	0,1	
<u>C. perfringens</u> A9635	7 x 10 ⁵	0,1	0,1	
	7 x 10 ⁶	0,1	0,1	

	Tamaño del inóculo, células/ml	CMI (mcg/ml) en		
		Bu-2313A	Bu-2313B	Tir
<u>B. fragilis</u> A20928-1	2,8 x 10 ⁶	0,006	0,013	
	2,8 x 10 ⁷	0,8	0,4	
<u>C. perfringens</u> A9635	1,2 x 10 ⁵	0,1	0,1	
	1,2 x 10 ⁶	100	25	

TABLA IX

Actividad bactericida

	Tamaño del inóculo, células/ml	CMI y CMB					
		Bu-2313A		Bu-2313B		T	
		CMI	CMB	CMI	CMB		
<u>B. fragilis</u> A20928-1	2,8 x 10 ⁶	0,03	> 0,8	0,006	> 0,8	0	
<u>C. perfringens</u> A9635	1,2 x 10 ⁵	0,1	12,5	0,1	12,5	0	
<u>S. pyogenes</u> A20201	6 x 10 ⁵	0,4	12,5	0,2	12,5	0	

TABLA VIII

Efecto del tamaño del inóculo

Tamaño del inóculo, células/ml	CMI (mcg/ml) en agar GAM			
	Bu-2313A	Bu-2313B	Tirandamicina	Clindamicina
1,2 x 10 ⁶	0,1	0,05	0,2	0,025
1,2 x 10 ⁷	0,1	0,1	0,2	0,025
7 x 10 ⁵	0,1	0,1	0,8	0,0125
7 x 10 ⁶	0,1	0,1	0,8	0,0125

Tamaño del inóculo, células/ml	CMI (mcg/ml) en caldo GAM			
	Bu-2313A	Bu-2313B	Tirandamicina	Clindamicina
2,8 x 10 ⁶	0,006	0,013	0,006	0,025
2,8 x 10 ⁷	0,8	0,4	0,2	0,05
1,2 x 10 ⁵	0,1	0,1	0,1	0,025
1,2 x 10 ⁶	100	25	12,5	12,5

TABLA IX

Actividad bactericida

Tamaño del inóculo, células/ml	CMI y CMB (mcg/ml)							
	Bu-2313A		Bu-2313B		Tirandamicina		Clindamicina	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
2,8 x 10 ⁶	0,03	> 0,8	0,006	> 0,8	0,025	> 0,8	0,05	0,4
1,2 x 10 ⁵	0,1	12,5	0,1	12,5	0,1	3,1	0,025	0,05
6 x 10 ⁵	0,4	12,5	0,2	12,5	0,4	> 12,5	0,05	6,3

1 Niveles en sangre en ratones

Se determinaron los niveles en sangre en ratones, después de la administración subcutánea u oral de Bu-2313-B (sal sódica), clindamicina y Flagyl, a niveles de dosificación graduados (100, 50, 25, y 12,5 mg/kg). Se recogieron muestras de sangre de los senos orbitales y se analizaron por el método de disco de papel-placa de agar empleando B. fragilis A20926 como organismo de ensayo. Los resultados se encuentran en la Tabla X. Los niveles máximos en sangre obtenidos con Bu-2313B fueron aproximadamente 3 ó 4 veces mayores que los de la clindamicina por las vías parenteral y oral mientras que el Flagyl presentó mejor absorción que el Bu-2313B.

15 TABLA X

Niveles en sangre en ratones

Administración subcutánea

<u>Antibióticos</u>	<u>dosis</u>	<u>Niveles en sangre (mcg/ml)</u>			
		<u>15 min.</u>	<u>30 min.</u>	<u>1 hora</u>	<u>2 horas</u>
Bu-2313B	100 mg/kg	28	34	38	29
	50	25	27	20	9,3
	25	12	10	4,6	0,9
	12,5	4,4	1,7	0,4	-
Clindamicina	100	11	9,5	5,2	0,4
	50	7,0	5,8	3,4	0,3
	25	3,8	2,1	0,8	0,4
	12,5	1,9	1,2	0,5	0,3
Flagyl	100	98	121	98	40
	50	32	32	26	12
	25	16	15	12	8,3
	12,5	6,7	3,8	3,0	-

20
25
30

	<u>Administración oral</u>					
	<u>Antibióticos</u>	<u>Dosis</u>	<u>Niveles en sangre (mcg/ml)</u>			
<u>30 min.</u>			<u>1 hora</u>	<u>3 horas</u>	<u>5 horas</u>	
1	Bu-2313B	100 mg/kg	12	5,5	0,4	0,3
5		50	3,0	0,7	0,2	0,1
		25	0,4	0,2	0,1	-
		12,5	0,3	0,2	0,1	-
	Clindamicina	100	2,8	1,3	0,6	-
		50	0,9	0,5	0,3	-
10		25	0,8	0,5	0,3	-
		12,5	0,6	0,4	0,3	-
	Flagyl	100	56	41	24	13
		50	20	15	11	-
		25	8,8	6,7	6,1	-
15		12,5	6,0	6,0	3,0	-

Actividad in vivo

La eficacia de las sustancias Bu-2313A y Bu-2313B in vivo fue determinada en ratones infectados con B. fragilis A20926 (local), C. perfringens A9635 y S. pyogenes A20201 (sistémico).

Se estableció una infección localizada de B. fragilis mediante inyección subcutánea en el cuello dorsal de los ratones de 0,5 ml de la suspensión bacteriana conteniendo $2-5 \times 10^6$ células más 10 mg de celulosa microcristalina. El tratamiento se realizó por vía subcutánea u oral una vez al día durante 5 días, empezando 30 minutos después del ataque. Se utilizó un grupo de cinco ratones para cada nivel de dosis y los animales se diseccionaron al sexto día para medir el tamaño del absceso subcutáneo. La respuesta de cada animal fue puntuada de 0 a 5 de acuerdo con el tamaño de la lesión

1 y la suma de las puntuaciones de las lesiones se dividió por
el número de ratones utilizados en un grupo para obtener la
puntuación media para cada tratamiento y grupo de control.
Tomando la puntuación media del grupo de control como nivel
5 de infectividad del 100 %, se calculó el nivel relativo de
infección para cada uno de los grupos de tratamiento y se
estimó un valor de la DP_{50} mediante una representación del
log prohib. Los resultados obtenidos con Bu-2313B se encuen-
10 tran en la Tabla XI junto con los de la clindamicina y el
Flagyl. La clindamicina era más activa que el Bu-2313B y que
el Flagyl en este modelo de infección.

Se produjo una infección sistémica en ratones de C.
perfringens o S. pyogenes mediante ataque intraperitoneal
con una dosis letal de la sustancia patógena en una suspen-
15 sión al 5 % de mucina gástrica de cerdo (American Laborato-
ries): El antibiótico se administró por vía subcutánea u oral
inmediatamente antes del ataque con las bacterias. Se deter-
minó la DP_{50} al cabo de 5 días. Como muestra la Tabla XII,
la sustancia Bu-2313B proporciona una protección bastante
20 buena contra estas infecciones sistémicas por administración
subcutánea y oral, mientras que la sustancia Bu-2313A es
inactiva por la vía oral. La clindamicina resultó la más ac-
tiva en estos ensayos in vivo.

25

30

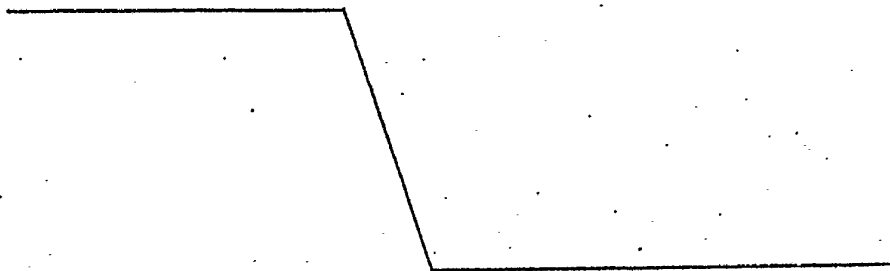


TABLA XI

Infección localizada con B. fragilis

Tratamiento subcutáneo

<u>Antibióticos</u>	<u>Dosis (mg/kg)</u>	<u>Puntuación individual</u>	<u>Suma de las puntuaciones</u>	<u>Puntuación media</u>	<u>Nivel de infectividad, (%)</u>	<u>DP50 s.c.</u>
Bu-2313B sal sódica	50 x 5	0, 2, 3, 3, 3	11	2,2	52,4	60 mg/kg
	12,5 x 5	2, 3, 3, 3, 3	14	2,8	66,7	
	3,1 x 5	3, 3, 3, 4, 4	17	3,4	81,0	
	0,8 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20	4,0	95,2	
Clindamicina	50 x 5	0, 0, 1, 1, 2	4	0,8	19,0	2,8 mg/kg
	12,5 x 5	1, 1, 1, 2, 2	7	1,4	33,3	
	3,1 x 5	2, 2, 2, 2, 2	10	2,0	47,6	
	0,8 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20	4,0	95,2	
Flagyl	50 x 5	2, 2, 2, 2, 2	10	2,0	47,6	35 mg/kg
	12,5 x 5	2, 2, 2, 3, 3	12	2,4	57,1	
	3,1 x 5	3, 3, 3, 4, 4	17	3,4	81,0	
	0,8 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20	4,0	95,2	
Control		4, 4, 4, 4, 5	21	4,2	100	

1

5

10

15

20

25

80

TABLA XI

Infección localizada con B. frag

Tratamiento subcutáneo

1
5
10
15
20
25
30

<u>Antibióticos</u>	<u>Dosis (mg/kg)</u>	<u>Puntuación individual</u>	<u>Suma de las puntuaciones</u>	<u>Pu</u>
Bu-2313B sal sódica	50 x 5	0, 2, 3, 3, 3	11	
	12,5 x 5	2, 3, 3, 3, 3	14	
	3,1 x 5	3, 3, 3, 4, 4	17	
	0,8 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20	
Clindamicina	50 x 5	0, 0, 1, 1, 2	4	
	12,5 x 5	1, 1, 1, 2, 2	7	
	3,1 x 5	2, 2, 2, 2, 2	10	
	0,8 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20	
Flagyl	50 x 5	2, 2, 2, 2, 2	10	
	12,5 x 5	2, 2, 2, 3, 3	12	
	3,1 x 5	3, 3, 3, 4, 4	17	
	0,8 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20	
Control		4, 4, 4, 4, 5	21	

TABLA XI

Infección localizada con *B. fragilis*

<u>s</u> <u>g)</u>	<u>Puntuación</u> <u>individual</u>	<u>Suma de las</u> <u>puntuaciones</u>	<u>Puntuación</u> <u>media</u>	<u>Nivel de in</u> <u>fectividad,</u> <u>(%)</u>	<u>DP₅₀ s.c.</u>
5	0, 2, 3, 3, 3	11	2,2	52,4	60 mg/kg
5	2, 3, 3, 3, 3	14	2,8	66,7	
5	3, 3, 3, 4, 4	17	3,4	81,0	
5	4, 4, 4, 4, 4	20	4,0	95,2	
5	0, 0, 1, 1, 2	4	0,8	19,0	2,8 mg/kg
5	1, 1, 1, 2, 2	7	1,4	33,3	
5	2, 2, 2, 2, 2	10	2,0	47,6	
5	4, 4, 4, 4, 4	20	4,0	95,2	
5	2, 2, 2, 2, 2	10	2,0	47,6	35 mg/kg
5	2, 2, 2, 3, 3	12	2,4	57,1	
5	3, 3, 3, 4, 4	17	3,4	81,0	
5	4, 4, 4, 4, 4	20	4,0	95,2	
	4, 4, 4, 4, 5	21	4,2	100	

¹ TABLA XI (Cont.)

Tratamiento oral		Dosis (mg/kg)	Puntuación individual	Suma de las puntuaciones	Puntuación media	Nivel de in- fectividad, (%)	DP ₅₀ s.o. ~ 220 mg/kg
Antibióticos							
5	Bu-2313B, sal sódica	100 x 5	2, 2, 2, 3, 3	12	2,4	57,1	~ 220 mg/kg
		25 x 5	3, 3, 3, 3, 3	15	3,0	71,4	
		6,3 x 5	3, 3, 3, 4, 4, 3, 3	17	3,4	81,0	
		1,6 x 5	4, 4, 4, 4, 4, 3, 3	20	4,0	95,2	
10	Clindamicina	100 x 5	0, 0, 0, 1, 1	2	0,4	9,5	11 mg/kg
		25 x 5	1, 2, 2, 2, 2, 3, 3	9	1,8	42,9	
		6,3 x 5	2, 2, 3, 3, 3, 3	13	2,6	61,9	
		1,6 x 5	4, 4, 4, 4, 4, 3, 3	20	4,0	95,2	
15	Flagyl	100 x 5	0, 1, 2, 2, 3	8	1,6	38,1	50 mg/kg
		25 x 5	2, 2, 3, 3, 3	13	2,6	61,9	
		6,3 x 5	3, 3, 3, 4, 4, 3, 3	17	3,4	81,0	
		1,6 x 5	4, 4, 4, 4, 4, 4	20	4,0	95,2	
20	Control		4, 4, 4, 4, 5	21	4,2	100	

25

30

TABLA XI (Cont.)

1

Tratamiento oral

<u>Antibióticos</u>	<u>Dosis (mg/kg)</u>	<u>Puntuación individual</u>	<u>Suma de las puntuaciones</u>	
5	Bu-2313B, sal sódica	100 x 5	2, 2, 2, 3, 3	12
		25 x 5	3, 3, 3, 3, 3	15
		6,3 x 5	3, 3, 3, 4, 4	17
		1,6 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20
10	Clindamicina	100 x 5	0, 0, 0, 1, 1	2
		25 x 5	1, 2, 2, 2, 2	9
		6,3 x 5	2, 2, 3, 3, 3	13
		1,6 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20
15	Flagyl	100 x 5	0, 1, 2, 2, 3	8
		25 x 5	2, 2, 3, 3, 3	13
		6,3 x 5	3, 3, 3, 4, 4	17
		1,6 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20
20	Control		4, 4, 4, 4, 5	21

25

30

TABLA XI (Cont.)

<u>Dosis (mg/kg)</u>	<u>Puntuación individual</u>	<u>Suma de las puntuaciones</u>	<u>Puntuación media</u>	<u>Nivel de infectividad, (%)</u>	<u>DP₅₀ s.o.</u>
100 x 5	2, 2, 2, 3, 3	12	2,4	57,1	~ 220 mg/kg
25 x 5	3, 3, 3, 3, 3	15	3,0	71,4	
6,3 x 5	3, 3, 3, 4, 4	17	3,4	81,0	
1,6 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20	4,0	95,2	
100 x 5	0, 0, 0, 1, 1	2	0,4	9,5	11 mg/kg
25 x 5	1, 2, 2, 2, 2	9	1,8	42,9	
6,3 x 5	2, 2, 3, 3, 3	13	2,6	61,9	
1,6 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20	4,0	95,2	
100 x 5	0, 1, 2, 2, 3	8	1,6	38,1	50 mg/kg
25 x 5	2, 2, 3, 3, 3	13	2,6	61,9	
6,3 x 5	3, 3, 3, 4, 4	17	3,4	81,0	
1,6 x 5	4, 4, 4, 4, 4	20	4,0	95,2	
	4, 4, 4, 4, 5	21	4,2	100	

TABLA XII

Infección sistémica con *C. Perfringens* y *S. Pyogenes*

	DP ₅₀ (mg/kg)			
	<i>C. perfringens</i>		<i>S. pyogenes</i>	
	<u>s.c.</u>	<u>p.o.</u>	<u>s.c.</u>	<u>p.o.</u>
Bu-2313A	6,25	AN a 50	7,6	AN a 25
Bu-2313B	6,25	30	9	25
Tirandamicina	17	60	9,7	50
Clindamicina	0,08	0,22	0,3	2,1
Flagyl	31	60	NE	NE

AN: actividad nula

NE: no ensayado.

Toxicidad aguda.

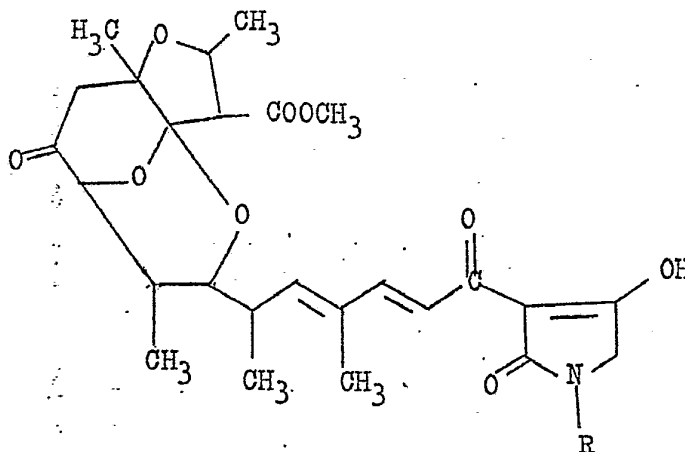
La toxicidad aguda DL₅₀ de las sustancias Bu-2313A y B fue determinada por las vías subcutáneas, intraperitoneal y oral. Se ensayaron las formas de ácido libre y de sal sódica del Bu-2313. Los resultados se encuentran en la Tabla XIII. El Bu-2313B presenta una toxicidad considerablemente menor que el Bu-2313A, lo que es interesante a la vista de la sola ligera diferencia estructural entre los dos componentes (presencia o ausencia de un grupo N-metilo).

TABLA XIII

Toxicidad aguda

	DL ₅₀ (mg/kg)		
	<u>s.c.</u>	<u>i.p.</u>	<u>p.o.</u>
Bu-2313A (ácido libre)	90	14	90
Bu-2313A (sal sódica)	90	14	-
Bu-2313B (ácido libre)	225	115	-
Bu-2313B (sal sódica)	200	55	280

1 Un aspecto de esta invención se refiere a un compues-
to antibiótico de fórmula:



donde R es H o CH₃, o una mezcla de los mismos, o de una
sal no tóxica y farmacéuticamente aceptable del mismo (y
preferiblemente la sal sódica).

15 Otro aspecto de esta invención se refiere al compues-
to antibiótico denominado Bu-2313A, que es una sustancia
ácida soluble en alcoholes inferiores, acetato de etilo,
cloroformo y benceno; ligeramente soluble en hexano y agua
alcalina, pero prácticamente insoluble en agua; que da reac-
ción positiva con cloruro férrico pero reacciones negati-
20 vas con ninhidrina, antrona y reactivos de Sakaguchi y
Tollen y que en forma purificada funde a 116-118°C aproxima-
damente; es ópticamente activa, con un $[\alpha]_D^{26}$ de aproxima-
damente -58° (c = 0,5, metanol); presenta un pKa' de 5,2
aproximadamente en metanol acuoso al 50 % con un equivalente
25 de valoración de 519; tiene un pico de ión molecular a m/e
517 en su espectro de masas; responde a la fórmula empí-
rica C₂₇H₃₅NO₉ y sus espectros ultravioleta, infrarrojo y
de resonancia magnética nuclear son sustancialmente los in-
dicados en las Figuras 1, 3 y 5 de los dibujos, respectiva-
30 mente, o a una sal no tóxica y farmacéuticamente aceptable

1 del mismo (y preferiblemente la sal sódica).

5 Otro aspecto de esta invención se refiere al compuesto antibiótico denominado Bu-2313B, que es una sustancia ácida soluble en alcoholes inferiores, acetato de etilo, cloroformo y benceno; ligeramente soluble en hexano y agua alcalina pero prácticamente insoluble en agua; que da reacción positiva con cloruro férrico pero reacciones negativas con ninhidrina, antrona y reactivos de Sakaguchi y Tollen; y que en forma purificada funde aproximadamente a 160-162°C; es ópticamente activo con un $[\alpha]_D^{25}$ de aproximadamente $-69,9^\circ$ (c = 0,3, metanol) y $-34,9^\circ$ (c = 0,93, CHCl₃); presenta un pKa' de 4,9 aproximadamente en metanol acuoso al 46 % con un equivalente de valoración de 509; tiene un pico de ión molecular a m/e 503 en su espectro de masas; responde a la fórmula empírica C₂₆H₃₃NO₉ y presenta unos espectros ultravioleta, infrarrojo y de resonancia magnética nuclear sustancialmente como los descritos en las Figuras 2, 4 y 6 de los dibujos, respectivamente, o a una sal no tóxica y farmacéuticamente aceptable del mismo (preferiblemente la sal sódica).

15 Otro aspecto de esta invención se refiere a un procedimiento microbiológico para la preparación de una mezcla de los antibióticos Bu-2313A y Bu-2313B que consiste en cultivar una cepa de Micropolyspora caesia con las características de identificación de ATCC 31295, 31296, 31297 ó 31298, en condiciones aerobias sumergidas, en un medio de cultivo acuoso que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno, hasta que dicho microorganismo ha producido en el medio de cultivo una cantidad sustancial de dicha mezcla

20
25
30

1 antibiótica. En una realización preferida, el procedimiento incluye la etapa adicional de recuperar la mezcla antibiótica del medio de cultivo. En una realización más preferida, el microorganismo es Micropolyspora caesia ATCC 31298.

5 Otro aspecto de esta invención se refiere a un procedimiento microbiológico para la preparación del antibiótico Bu-2313B que consiste en (a) cultivar una cepa de Micropolyspora caesia con las características de identificación de ATCC 31295, 31296, 31297 ó 31298, en condiciones aerobias sumergidas, en un medio de cultivo acuoso que contiene
10 fuentes asimilables de carbono y nitrógeno, hasta que dicho microorganismo ha producido en el medio de cultivo una cantidad sustancial de actividad antibiótica; (b) recuperar la mezcla antibiótica producida en la etapa (a) del medio de
15 cultivo y (c) separar Bu-2313B de dicha mezcla antibiótica mediante cromatografía en una resina polimérica macrorreticular. En una realización preferida, el microorganismo es Micropolyspora caesia ATCC 31298.

20 Otro aspecto de esta invención se refiere a un procedimiento microbiológico para la preparación del antibiótico Bu-2313A que consiste en: (a) cultivar una cepa de Micropolyspora caesia con las características de identificación de ATCC 31295, 31296, 31297 ó 31298, en condiciones aerobias sumergidas, en un medio acuoso de cultivo que contiene
25 fuentes asimilables de carbono y nitrógeno, hasta que dicho microorganismo ha producido en el medio de cultivo una cantidad sustancial de actividad antibiótica; (b) recuperar la mezcla antibiótica producida en la etapa (a) del medio de
30 cultivo; (c) separar la porción principal de Bu-2313B de dicha mezcla antibiótica por cromatografía en una resina

1 polimérica macrorreticular y (d) separar Bu-2313A del
Bu-2313B residual mediante cromatografía en gel de sílice.
En una realización preferida, el microorganismo es Micropo-
lyspora caesia ATCC 31298.

5 Los compuestos antibióticos de esta invención inclu-
yen el complejo Bu-2313, sus componentes Bu-2313A y Bu-2313B
y sus sales y mezclas. La invención incluye dentro de es-
tos límites las composiciones farmacéuticas que contienen
10 como mínimo una de las sustancias antibióticas antes mencio-
nadas junto con un vehículo compatible farmacéuticamente
aceptable. Las composiciones también pueden contener otros
agentes antibacterianos. Las composiciones pueden prepararse
se en cualquier forma farmacéutica apropiada para la vía de
administración en cuestión. Son ejemplos de estas composi-
15 ciones las composiciones sólidas para administración oral,
como tabletas, cápsulas, píldoras, polvos y gránulos; las
composiciones líquidas para administración oral como solu-
ciones, suspensiones, jarabes y elixires y los preparados
para administración parenteral como soluciones, suspensiones,
20 o emulsiones estériles.

Como en el caso de otros antibióticos, la posología
para el Bu-2313A o B dependerá del peso, edad y estado ge-
neral del paciente así como de la naturaleza de la enfermedad
y se deja a la discreción del médico. En general, la dosis
25 oral estará comprendida entre 50 y 750 mg de Bu-2313A ó B
(o de una mezcla de los mismos), suministrada 3 ó 4 veces
al día.

La invención es ilustrada mediante los siguientes
ejemplos que de ningún modo la limitan.

30

EJEMPLO 1

Preparación del cultivo de siembra y fermentación a pequeña escala en matraz sacudido

Se utiliza un cultivo en tubo inclinado de agar, bien desarrollado, del organismo productor de Bu-2313, cepa E864-61 nº Y-29, para inocular 100 ml de un medio vegetativo líquido contenido en un Erlenmeyer de 500 ml, que comprende los siguientes ingredientes: 3 % de glucosa, 3 % de harina de soja, 1 % de licor de infusión de maíz y 0,5 % de carbonato cálcico. El pH del medio se ajusta a 7,0 antes de esterilizarlo. El cultivo de siembra se incuba a 34°C durante 3 días en un sacudidor rotatorio (250 rpm) y se transfieren 2-3 ml del cultivo a un Erlenmeyer de 500 ml que contiene 100 ml del medio de fermentación constituido por 3 % de sacarosa, 3 % de harina de linaza, 0,3 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,003 % de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,5 % de CaCO_3 . La producción antibiótica alcanza un máximo al cabo de 4-7 días de sacudir a 28°C. El pH del caldo asciende gradualmente al progresar la fermentación y alcanza un valor de 8,1-8,8 cuando se ha producido una potencia antibiótica de 150 mcg/ml. La actividad antibiótica en el caldo de fermentación se determina por el método de disco de papel-placa de agar empleando Bacteroides fragilis como organismo de ensayo cultivado sobre placas de agar GAM en condiciones anaerobias.

EJEMPLO 2

Fermentación en tanque a gran escala

Un cultivo de siembra (110 litros) preparado a partir de un cultivo en tubo inclinado de agar bien desarrollado de la cepa E864-61 nº Y-29, se inocula en 1500 li-

1 tros de un medio de fermentación que contiene 3 % de glucosa,
3 % de harina de soja, 1 % de licor de infusión de maíz y
0,5 % de CaCO_3 , en un tanque de 2500 litros. La fermenta-
5 ción se realiza a 31°C agitando a 200 rpm y a un caudal de
aireación de 1000 litros/minuto. Al cabo de 72 horas, el pH
del caldo de fermentación alcanza un valor de 8,2 y la po-
tencia antibiótica analizada es de 265 mcg/ml.

EJEMPLO 3

Aislamiento y purificación

10 Se filtra un caldo de fermentación (1500 litros;
análisis 200 mcg/ml) con un auxiliar de filtración y la tor-
ta micelial se lava con agua. El filtrado se combina con las
aguas de lavado, se ajusta a pH 8,3 y se aplica a una colum-
na de resina macrorreticular (DIAION HP-20, 100 litros). La
15 columna se lava con 400 litros de agua y 410 litros de una
solución acuosa de metanol al 40 % sucesivamente y después
se desarrolla con 400 litros de una solución acuosa de me-
tanol al 95 %. Las fracciones activas se combinan y concen-
tran a vacío para formar un concentrado acuoso. La torta mi-
20 celial húmeda antes obtenida (360 kg) se suspende en 300 li-
tros de metanol y se extrae con agitación. Esta operación
se repite dos veces y el extracto metanólico combinado (700
litros) se concentra a vacío. Los dos concentrados acuosos
obtenidos del eluato HP-20 y el extracto de la torta mi-
25 celial se combinan y se evaporan de nuevo a vacío (hasta
70 litros) y la actividad del concentrado se extrae dos ve-
ces con 35 litros cada vez de acetato de etilo. El extracto
se concentra a vacío a sequedad para dar 1,03 kg de un só-
30 lido oleoso (220 mcg/mg) que se disuelve en 2,2 litros de

1 una mezcla 20:1 de acetato de etilo y metanol y se aplica a
una columna de carbón activo (volumen: 5 litros). La columna
se desarrolla con la misma mezcla disolvente y los eluatos
activos se combinan y concentran a vacío para dar un sólido
5 pardo oscuro que se cristaliza en metanol caliente dando
279 g de un polvo cristalino amarillo parduzco (650 mcg/mg).

El material cristalino así obtenido es una mezcla de
componentes A y B, cuya separación se realiza por cromatografía
10 en Diaion HP-20. Se disuelven 100 g de la mezcla en me-
tanol acuoso al 90 % y la solución se aplica a una columna
de resina HP-20, (5 litros). La columna se desarrolla con
metanol acuoso al 80 % para dar dos fracciones activas. Del
concentrado de la primera fracción activa (24 litros) se obtie-
nen unas agujas cristalinas de color amarillo pálido de
15 Bu-2313B (45 g) que se recristalizan dos veces de metanol
para dar un preparado analíticamente puro (32 g). El segundo
eluato activo (23 litros) se concentra a vacío para dar una
mezcla de componentes A y B (alrededor de 20 g) que se sepa-
ra por cromatografía en columna de gel de sílice eluida con
20 cloroformo. Se obtienen cristales puros del componente A
(4 g) después de recristalizar las fracciones que se mueven
rápidamente y se recupera una cantidad adicional de componen-
te B (7,5 g) de la última parte de los eluatos.

25 Los análisis de los productos cristalinos puros son
los siguientes:

Bu-2313A - Calculado para $C_{27}H_{35}NO_9$: C, 62,65; H, 6,82;
N, 2,71; O, 27,82. Encontrado: C, 62,57;
H, 6,64; N; 2,60; O, 28,20 (por diferencia).

30

1 Bu-2313B - Calculado para $C_{26}H_{33}NO_9$: C, 62,03; H, 6,56;
N, 2,78; O, 28,63. Encontrado: C, 61,77; H, 6,80;
N, 2,65; O, 28,78 (por diferencia).

EJEMPLO 4

5 Preparación de un solvato bromobencénico cristalino de

Bu-2313B

Se disuelven 100 mg de Bu-2313B en 4 ml de bromoben-
ceno caliente al que se añade gota a gota éter de petróleo
hasta que se induce una ligera turbidez. La solución se deja
10 en reposo durante la noche a la temperatura ambiente para
completar la cristalización. Se obtiene el solvato de bromo-
benceno de Bu-2313B como agujas amarillas (80 mg), $[\alpha]_D^{21} =$
 $-51,2^\circ$ (c = 0,88, metanol). λ_{max} en etanol: 225, 295 (hombro),
352 y 369 nm. Espectro de RMN: 7,1 ppm (5H) para el
15 bromobenceno. Análisis: Calculado para $C_{32}H_{40}NO_{10}Br$
($C_{26}H_{33}NO_9 \cdot C_6H_5Br \cdot H_2O$): C, 56,64; H, 5,90; N, 2,06; Br, 11,80;
O, 23,60. Encontrado: C, 56,87; H, 5,84; N, 2,19; Br, 12,10;
O, 23,00 (por diferencia).

EJEMPLO 5

20 Preparación de la sal sódica de Bu-2313B

A una solución de 200 mg de Bu-2313B en 10 ml de cloro-
ruro de metileno se añaden 30 ml de agua. A la solución se
añade gota a gota y agitando NaOH 1 N hasta pH 11,5. Des-
pués de agitar durante 30 minutos, se separa la capa de di-
25 solvente y la capa acuosa se extrae dos veces con 30 ml cada
vez de n-butanol. Los extractos se combinan y concentran a
vacío. El sólido así obtenido se disuelve en una pequeña
cantidad de acetona y se precipita por adición de n-hexano
para dar 176 mg de sal sódica de Bu-2313B. Una parte de es-
30 te material (45 mg) se cristaliza de una mezcla de benceno-

1 metanol para dar 36 mg de cristales de color amarillo pálido
do que funden a 236-241°C (desc.), $[\alpha]_D^{23} = -7,4$ (c = 0,94,
metanol). Análisis: Calculado para $C_{26}H_{32}NO_9Na \cdot H_2O$: C, 57,46;
H, 6,26; N, 2,58; Na, 4,24; O, 29,46.
5 Encontrado: C, 57,57; H, 6,29; N, 2,39;
Na, 4,21; O, 29,54 (por diferencia).

EJEMPLO 6

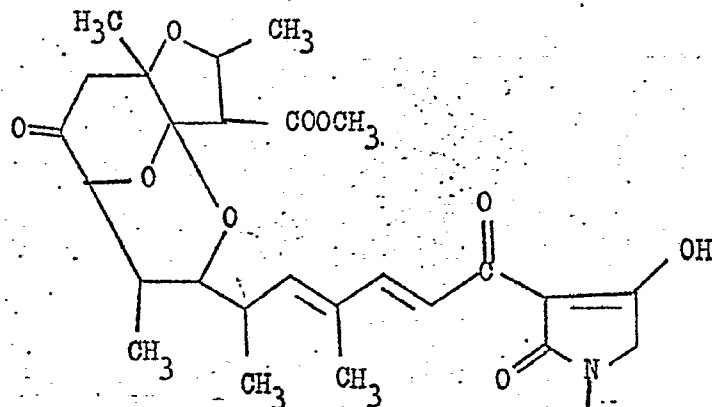
Preparación de la sal sódica de Bu-2313A

10 Se repite el procedimiento general del Ejemplo 5 a -
excepción de que el Bu-2313B allí utilizado se sustituye por
una cantidad igual de Bu-2313B y se obtiene así la sal só-
dica de Bu-2313A.

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento microbiológico para la prepara-
ción de un nuevo complejo antibiótico Bu-2313 y sus compo-
nentes bioactivos Bu-2313A y Bu-2313B de fórmula:



30 donde R es H en el componente Bu-2313B y $-CH_3$ en el compo-
nente Bu-2313A, o una sal no tóxica farmacéuticamente acep-
table de los mismos; cuyo procedimiento se caracteriza por-
que consiste en:

1

a) cultivar una cepa de Micropolyspora caesia con las características de identificación de ATCC 31295, - 31296, 31297 ó 31298, en condiciones aerobias sumergidas en un medio acuoso de cultivo que contiene -

5

fuentes asimilables de carbono y nitrógeno, hasta que dicho microorganismo ha producido en el medio de cultivo una cantidad sustancial de actividad -

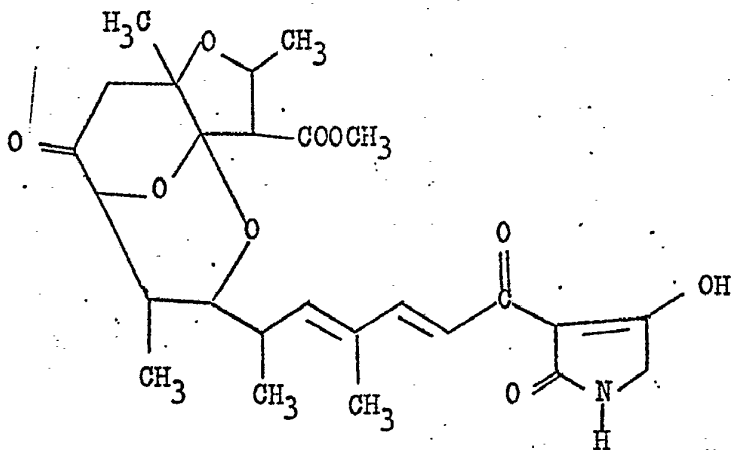
10

b) recuperar la mezcla antibiótica, producida en la etapa (a), del medio de cultivo;

c) separar los componentes bioactivos Bu-2313A y - Bu-2313-B de la mezcla antibiótica mediante cromatografía.

15

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde la fórmula del componente activo Bu-2313B es:



20

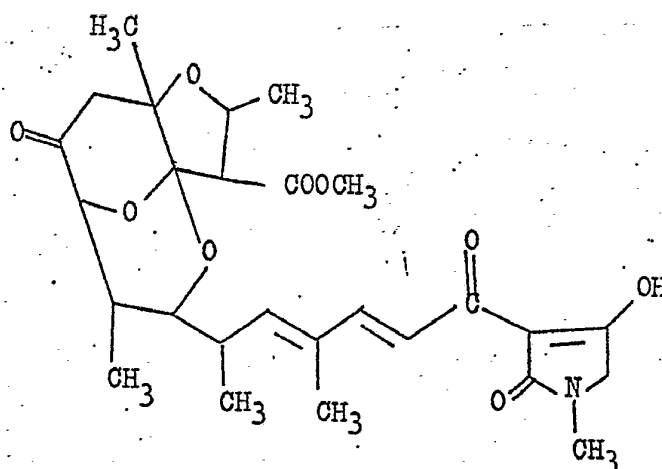
25

o una sal no tóxica y farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2, donde el compuesto obtenido es la sal sódica de Bu-2313B.

4. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde la fórmula del componente activo Bu-2313A es:

30



o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un procedimiento según la reivindicación 4, donde el compuesto obtenido es la sal sódica de Bu-2313A.

6. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde el componente antibiótico denominado Bu-2313A, presenta las siguientes propiedades: es una sustancia ácida soluble en alcoholes inferiores, acetato de etilo, cloroformo y benceno; ligeramente soluble en hexano y agua alcalina pero prácticamente insoluble en agua; da reacción positiva con cloruro férrico pero reacciones negativas con ninhidrina, antrona, y reactivos de Sakaguchi y Tollen; y en forma pura funde a 116-118°C aproximadamente; es ópticamente activo, con un $[\alpha]_D^{26}$ de -58° aproximadamente (c = 0,5, metanol); presenta un pKa' de 5,2 aproximadamente en etanol acuoso al 50% con un equivalente de valoración de 519; tiene un pico de ión molecular a m/e 517 en su espectro de masas; responde a la fórmula empírica $C_{27}H_{35}NO_9$; y presenta los espectros ultravioleta, infrarrojo y de resonancia magnética nuclear sustancialmente como los indicados en las Figuras 1, 3 ó 5 de los dibujos, respectivamente; o una sal no tóxica y farmacéuticamente aceptable del mismo.

1 7. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde
el componente antibiótico denominado Bu-2313B, presenta -
las siguientes propiedades: es una sustancia ácida soluble
5 en alcoholes inferiores, acetato de etilo, cloroformo y ben-
ceno; ligeramente soluble en hexano y agua alcalina pero -
prácticamente insoluble en agua; da reacción positiva con
cloruro férrico pero reacciones negativas con ninhidrina,
antrona y reacciones de Sakaguchi y Tollen; y en forma pura
funde a 160-162°C aproximadamente; es ópticamente activo,-
10 con un $[\alpha]_D^{25}$ de aproximadamente -69,9° (c = 0,3, metanol) y
-34,9° (c = 0,93, CHCl₃); presenta un pKa' de 4,9 aproxima-
damente en etanol acuoso al 46% con un equivalente de valo-
ración de 509; tiene un pico de ión molecular a m/e 503 en
su espectro de masas; responde a la fórmula empírica -
15 $C_{26}H_{33}NO_9$; y presenta unos espectros ultravioleta, infrarro-
jo y de resonancia magnética nuclear sustancialmente como -
los de las Figuras 2, 4 y 6 de los dibujos, respectivamen-
te; o una sal no tóxica y farmacéuticamente aceptable del -
mismo.

20 8. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde
el microorganismo es Micropolyspora caesia ATCC 31298.

 9. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde
el producto que se recupera es el Bu-2313B.

25 10. El procedimiento de la Reivindicación 9, donde el
microorganismo es Micropolyspora caesia ATCC 31298.

 11. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde
el producto que se recupera es el Bu-2313A.

30 12. Un procedimiento según la Reivindicación 11, donde
el microorganismo es Micropolyspora caesia ATCC 31298.

1

13. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones precedentes donde el cultivo de la cepa tiene lugar en condiciones aerobias sumergidas, a un pH de 5,0 a 10,0 y a una temperatura de 20°C a 48°C.

5

14. Un procedimiento según las Reivindicaciones precedentes donde el cultivo tiene lugar a un pH de 6,0 a 8,0 y a una temperatura de 32°C a 42°C.

10

15. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones precedentes donde el medio nutritivo contiene además glicina.

15

16. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO PARA LA PREPARACION DE UN NUEVO COMPLEJO ANTIBIOTICO.

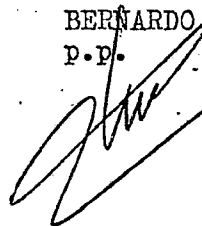
20

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de cuarenta y dos páginas mecanografiadas.

25

Madrid, 13 Julio 1.978

BERNARDO UNGRIA
p.p.



30