

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

|       |    |                       |       |
|-------|----|-----------------------|-------|
| 19 ES | 11 | NUMERO                | 10 AI |
|       | 21 | 482.443               |       |
|       | 22 | FECHA DE PRESENTACION |       |
|       |    | 12-7-1979             |       |

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con las leyes que figuran en la presente patente y en el contenido de la memoria adjunta.

|                      |                       |            |
|----------------------|-----------------------|------------|
| 30 PRIORIDADES:      | 32 FECHA              | 33 PAIS    |
| 31 NUMERO            |                       |            |
| 84537/78<br>69877/79 | 13-7-1978<br>6-6-1979 | Japón<br>" |

|                        |                                |                                      |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 47 FECHA DE PUBLICIDAD | 51 CLASIFICACION INTERNACIONAL | 62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
|                        | C12D 9/16; A61K 35/72          |                                      |

|  |
|--|
| 54 TITULO DE LA INVENCION  |
| "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LA SUSTANCIA ANTIBIOTICA KA-7038" |

|   |
|---|
| 71 SOLICITANTE (S)                      |
| KOWA COMPANY, LTD (F7080-K19 (KOWA)/MS) |

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

|  |
|--|
| 72 INVENTOR (ES)   |
| Takeo Deushi, Akio Iwasaki, Kazuhiro Kamiya, Toshimi Mizoguchi, Masahito Nakayama, Hisakatsu Itoh y Toshihito Mori |

|                 |
|-----------------|
| 73 TITULAR (ES) |
|                 |

|   |
|---|
| 74 REPRESENTANTE                            |
| DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-72.452) |

jga

1                    Esta invención se refiere a nuevos antibióticos, a un procedimiento para la preparación de los mismos, y un cultivo biológicamente puro para uso en el procedimiento.

5                    Los autores de la presente invención han tenido éxito en el aislamiento de una cepa productora de antibiótico perteneciente al género Streptomyces del suelo vegetal en Sannan-cho, Hikami-gun, Prefectura de Hyogo, Japón. Por sus características morfológicas, fisiológicas y de cultivo descritas más adelante, se supuso que la cepa era una especie nueva perteneciente al género Streptomyces, y se denominó Streptomyces sp. KC-7038. Esta cepa KC-7038 se depositó como FERM-P N.º 4388 en el Instituto de Investigación de Fermentaciones, Agencia de Ciencia y Tecnología Industriales, Japón; como ATCC número 31530 en la Colección Americana de Cultivos-Tipo.

15                   Se ha comprobado que los antibióticos producidos por la cepa KC-7038 son sustancias no descritas en la bibliografía y que tienen una acción antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Esta sustancia se denominó "sustancia KA-7038".

20                   Investigaciones ulteriores han conducido al descubrimiento de que la sustancia KA-7038 puede separarse todavía en siete antibióticos; KA-7038I, KA-7038II, KA-7038III, KA-7038IV, KA-7038V, KA-7038VI y KA-7038VII, y que éstos pueden convertirse fácilmente en sales de adición de ácido de los mismos por tratamiento con ácidos.

25                   Es un objeto de esta invención, por consiguiente, proporcionar una nueva sustancia antibiótica KA-7038 y sus sales de adición de ácido.

30

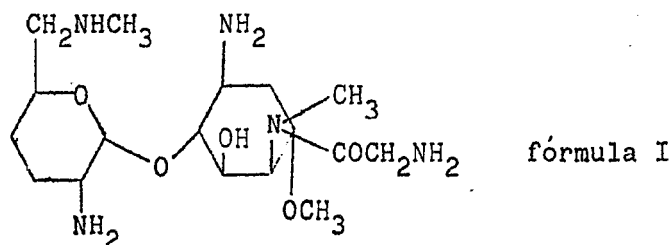
Otro objeto de esta invención es proporcionar un procedimiento para preparar la sustancia KA-7038.

Todavía otro objeto de esta invención es proporcionar una composición antibiótica que contiene la sustancia KA-7038 como ingrediente activo.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un cultivo biológicamente puro útil para la producción de la sustancia KA-7038.

Los anteriores y otros objetos de esta invención junto con sus ventajas resultarán más claros a partir de la descripción siguiente.

La sustancia antibiótica KA-7038 de esta invención puede expresarse por las fórmulas estructurales I a VII siguientes. Sustancia KA-7038I:



Las propiedades químicas y físicas de la sustancia KA-7038I se describen a continuación.

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

Rotación Específica:  $[\alpha]_D^{25} + 120,5^\circ$  (c 1,  $H_2O$ )

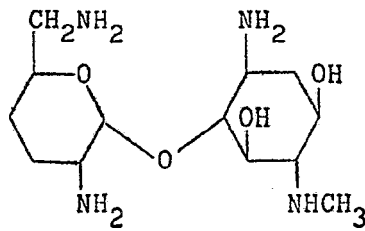
Punto de Fusión: 83 - 90°C

Espectro IR: Fig. 1

Sustancia KA-7038II:

1

5



fórmula II

10

Las propiedades químicas y físicas de la sustancia KA-7038II se describen a continuación.

Fórmula Molecular:  $C_{13}H_{28}O_4N_4$

Rotación Específica:  $[\alpha]_D^{25} + 61^\circ$  (c 1,  $H_2O$ )

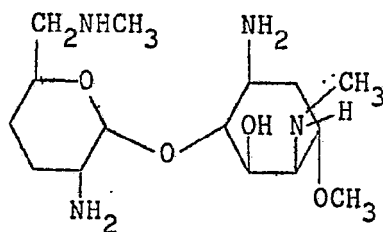
15

Punto de Fusión:  $85 - 102^\circ C$

Espectro IR: Fig. 2

Sustancia KA-7038III:

20



fórmula III

25

Las propiedades químicas y físicas de la sustancia KA-7038III se describen a continuación.

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

Rotación Específica:  $[\alpha]_D^{25} + 78^\circ$  (c 1,  $H_2O$ )

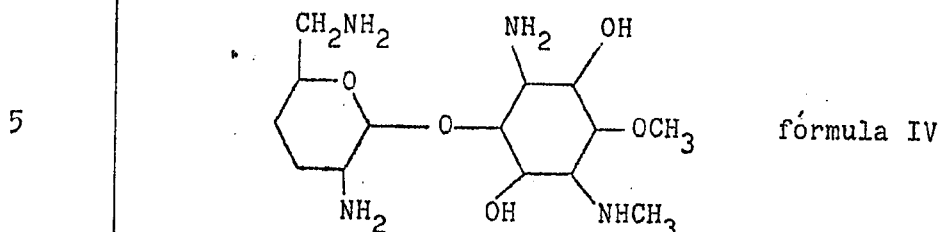
Punto de Fusión:  $74 - 83^\circ C$

30

Espectro IR: Fig. 3

06089

1 Sustancia KA-7038IV:



10 Las propiedades químicas y físicas de la sustancia KA-7038IV se describen a continuación.

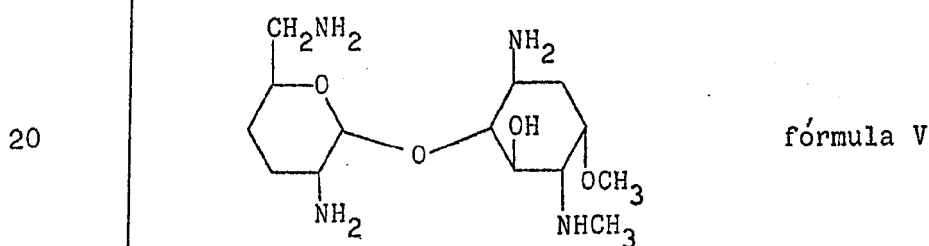
Fórmula Molecular:  $C_{14}H_{30}O_5N_4$

Rotación Específica:  $[\alpha]_D^{25} + 115^\circ$  (c 0,1,  $H_2O$ )

Punto de Fusión: 78 - 82°C

15 Espectro IR: Fig. 4

Sustancia KA-7038V:



25 Las propiedades químicas y físicas de la sustancia KA-7038V se describen a continuación.

Fórmula Molecular:  $C_{14}H_{30}O_4N_4$

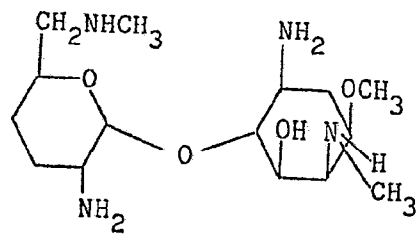
Rotación Específica:  $[\alpha]_D^{25} + 98^\circ$  (c 0,5,  $H_2O$ )

Espectro IR: Fig. 5

Sustancia KA-7038VI:

1

5



fórmula VI

10

Las propiedades químicas y físicas de la sustancia KA-7038VI se describen a continuación.

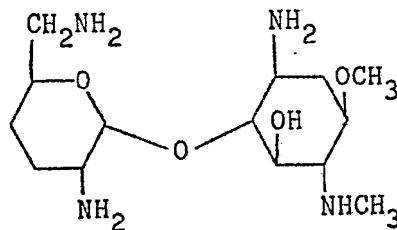
Fórmula Molecular:  $C_{15}H_{32}O_4N_4$

Rotación Específica:  $[\alpha]_D^{25} + 58^\circ$  (c 1, H<sub>2</sub>O)

Espectro IR: Fig. 6

Sustancia KA-7038VII:

15



fórmula VII

20

Las propiedades químicas y físicas de la sustancia KA-7038VII se describen a continuación.

Fórmula Molecular:  $C_{14}H_{30}O_4N_4$

25

Rotación Específica:  $[\alpha]_D^{25} + 59^\circ$  (c 1, H<sub>2</sub>O)

Espectro IR: Fig. 7

30

El nuevo antibiótico de esta invención puede producirse cultivando una cepa productora de la sustancia antibiótica KA-7038 perteneciente al género Streptomyces

06089

1 y aislando la sustancia antibiótica KA-7038 a partir del  
caldo de cultivo. Si se desea, una o más de las sustancias  
antibióticas KA-7038 I-VII se pueden separar de la sus-  
tancia KA-7038 resultante.

5 Las características morfológicas, fisiológicas  
y de cultivo de la cepa *Streptomyces* sp. KC-7038, un ejem-  
plo típico de la cepa productora de la sustancia KA-7038,  
se indican a continuación. A no ser que se especifique otra  
cosa, sus propiedades sobre diversos medios de cultivo se  
10 observaron por métodos ordinarios después de cultivarla du-  
rante 21 días a 27°C. Los colores se expresaron para un  
cultivo maduro de acuerdo con las clasificaciones de "Co-  
lor Harmony Manual" Container Corp. Amer. 1958).

#### I. Propiedades Morfológicas

15 Esta cepa produce hifas en el substrato e hifas  
aéreas. El micelio aéreo está ramificado de modo simple.  
La cadena de esporas maduras forma espirales compactas.  
Las espirales están constituidas por dos a tres vueltas.  
No se observa formación alguna de esporangio. Las esporas  
20 tienen forma desde oval a cilíndrica, de tamaño compendi-  
do entre 0,5-0,6 micras por 0,8-1,2 micras, y en cada ca-  
dena de esporas se forman 20 o más de dichas esporas. La  
superficie de la espora es ligeramente rugosa, pero se  
considera como lisa (debido a que no se forma ningún grá-  
nulo esclerótico claro).

#### II. Características de cultivo en diversos medios de cul- tivo

##### I. Agar de sacarosa-nitrato

Crecimiento: Pobre, incoloro

Micelio aéreo: Moderado, pulverulento, pardo cubierto

(2 li).

- 1 Pigmento soluble: Ninguno  
2. Agar de glucosa-asparagina  
Crecimiento: Moderado, crema (1 1/2 ca)  
Micelio aéreo: Moderado, pulverulento, blanco (a) a  
5 pardo cubierto (2 li)  
Pigmento soluble: Ninguno  
3. Agar de glicerol-asparagina  
Crecimiento: Pobre, incoloro  
Micelio aéreo: Pobre, pulverulento, blanco (a)  
10 Pigmento soluble: Ninguno  
4. Agar de sal inorgánica-almidón  
Crecimiento: Satisfactorio, perla (3 ba)  
Micelio aéreo: Satisfactorio, pulverulento, blanco (a)  
a gris plata (3 fe)  
15 Pigmento soluble: Ninguno  
5. Agar de tirosina  
Crecimiento: Satisfactorio, marfil (2 db)  
Micelio aéreo: Moderado, pulverulento, blanco (a)  
Pigmento soluble: Ninguno  
20 6. Agar nutriente  
Crecimiento: Satisfactorio, color ante (2 fb)  
Micelio aéreo: Ninguno  
Pigmento soluble: Ninguno  
7. Agar de extracto de levadura-extracto de malta  
25 Crecimiento: Satisfactorio, trigo claro (2 ea)  
Micelio aéreo: Pobre, pulverulento, blanco, (a)  
Pigmento soluble: Ninguno  
8. Agar de harina de avena  
Crecimiento: Moderado, incoloro  
30 Micelio aéreo: Satisfactorio, pulverulento, pardo cu-  
bierto (2 li)

- 1 Pigmento soluble: Ninguno  
9. Agar de peptona-extracto de levadura-hierro  
Crecimiento: Satisfactorio, crema (1 1/2 ca)  
Micelio aéreo: Ninguno
- 5 Pigmento soluble: Amarillo débil

### III. Propiedades fisiológicas

1. Intervalo de temperatura de crecimiento: 17 a 37°C  
2. Licuefacción de gelatina: Positiva  
3. Hidrólisis de almidón: Positiva  
10 4. Acción sobre la leche: Crecimiento nulo  
5. Formación de pigmento melanoide: Negativa

### IV. Utilización de fuentes de carbono

15 En un medio de agar de Pridham y Gottlieb, no se utilizan L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, sacarosa, inosita, L-ranmosa, rafinosa, y D-manita. En un medio resultante de la separación de sulfato de cobre a partir del medio de cultivo anterior, se utilizan D-xilosa y D-glucosa.

### V. Pared celular

20 Se formó ácido LL-diaminopimélico como componente de la pared celular.

25 A partir de las propiedades anteriores, se considera que la cepa KC-7038 pertenece al género Streptomyces. Especies que contienen cadenas de esporas espirales, micelios aéreos blancos a grises y esporas con una superficie lisa, y que no producen pigmento soluble ni utilizan inosita y sacarosa han sido seleccionadas a partir de cepas conocidas descritas en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ª edición (1975), ISP strains, de Shirling y Gottlieb, y "The Actinomycetes", de Waksman.

30 06089

1 Como resultado, se han identificado *Streptomyces argenteo-*  
*lus* (ISP 5226), *Streptomyces griseolosuffucus* (IMET JA  
3708), *Streptomyces griseofuscus* (ISP 5191) y *Streptomyces*  
*pyridomyceticus* (ISP 5024).

5 Sin embargo, la cepa KC-7038 difiere claramente  
de *Streptomyces argenteolus*, *Streptomyces griseolosuffucus*  
y *Streptomyces griseofuscus* en la utilización de fuentes  
de carbono exceptuando la inosita y la sacarosa. Por el  
contrario, la cepa KC-7038 es común con *Streptomyces pyri-*  
10 *domyceticus* en que no utiliza todas las fuentes de carbono  
en el medio de agar de Pridham y Gottlieb, pero aquéllas  
se diferencian claramente en los aspectos siguientes.

El crecimiento de *Streptomyces pyridomyceticus*  
es más pobre que el de la cepa KC-7038 en diversos medios  
15 de ISP, y apenas se observan micelios aéreos. La cepa  
KC-7038 no crece en un medio de leche desnatada, y su li-  
cuefacción de gelatina es positiva. En contraste, *Strepto-*  
*myces pyridomyceticus* muestra un resultado negativo en  
licuefacción de gelatina, y crece en un medio de leche  
20 desnatada. Además, son diferentes en la utilización de  
glucosa y sacarosa en un medio de Pridham-Gottlieb del que  
se ha separado sulfato de cobre. Los metabolitos resultan-  
tes de éstos difieren también unos de otros.

A partir de estos resultados, se ha llegado a  
25 la conclusión de que la presente cepa no corresponde a nin-  
guna de las especies conocidas, y es una especie nueva.  
Los autores de la presente invención la han denominado  
*Streptomyces* sp. KC-7038.

La cepa utilizada en esta invención puede some-  
30 terse a mutaciones por un medio mutante artificial utili-

1 zando luz ultravioleta, rayos X, diversos productos quí-  
micos tales como nitrosoguanidinas, nitrosourea o mitomi-  
cina, etc. Todos aquellos mutantes que tienen aptitud pa-  
ra producir la sustancia antibiótica KA-7038 pueden uti-  
5 lizarse en esta invención.

De acuerdo con esta invención, se proporciona  
también un cultivo biológicamente puro de *Streptomyces* sp.  
KC-7038 que tiene características identificadas como FERM-P  
Nº 4388, ATCC número 31530, y que tiene también la apti-  
10 tud para producir la sustancia antibiótica KA-7038 por  
fermentación en un medio nutriente que contiene una fuen-  
te de carbono, una fuente de nitrógeno y minerales.

Los medios de cultivo adecuados para uso en la  
fermentación de la cepa productora de la sustancia KA-7038  
15 del género *streptomyces* comprenden fuentes de carbono y  
nitrógeno y como ingredientes opcionales, sales inorgáni-  
cas (minerales), cantidades muy pequeñas de metales pesa-  
dos, etc.

Pueden utilizarse diversas fuentes de carbono,  
20 y ejemplos de fuentes de carbono preferidas son glucosa,  
almidón, sacarosa, fructosa, dextrina, melazas y glice-  
rina, que pueden utilizarse solas o en forma de mezclas  
adecuadas. Pueden utilizarse también hidrocarburos, alco-  
holes, ácidos orgánicos y aceites vegetales, si la cepa  
25 utilizada puede utilizarlos como fuente de carbono.

Ejemplos de fuentes de nitrógeno son harina de  
soja, extracto de levadura, levadura seca, peptona, ex-  
tracto de carne, licor de maceración de maíz, ácido Casa-  
mino, productos solubles de destilerías de alcohol, clo-  
30 ruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, urea

1 y nitrato de sodio, los cuales pueden utilizarse solos o  
en forma de mezclas adecuadas. Ejemplos de sales inorgáni-  
cas incluyen cloruro de sodio, nitratos, carbonato de cal-  
cio, cloruro de potasio, cloruro de cobalto y sulfato fe-  
5 rroso.

Sustancias inorgánicas y sustancias orgánicas  
(p. ej. aminoácidos) que favorecen el crecimiento de la  
cepa y promueven la producción de la sustancia KA-7038  
pueden añadirse también al medio de cultivo en caso requere-  
10 rido. Cuando se emplea un método de cultivo con aireación,  
se puede añadir también un antiespumante tal como aceites  
de ácidos grasos, aceites de silicona, aceite de semilla  
de algodón y parafinas al medio de cultivo.

El cultivo se puede llevar a cabo en un medio  
15 sólido. Preferiblemente, sin embargo, al igual que en el  
procedimiento general para la producción de antibióticos,  
se utiliza un método de cultivo líquido, especialmente un  
método de cultivo sumergido. El cultivo se lleva a cabo  
en condiciones aerobias, y la temperatura de cultivo es  
20 preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente  
35°C, más preferiblemente de aproximadamente 24° a aproxi-  
madamente 27°C. Preferiblemente, durante el cultivo, el  
pH del medio de cultivo se mantiene entre aproximadamente  
4 y aproximadamente 10. El período de cultivo es general-  
25 mente de aproximadamente 2 días a aproximadamente 10 días.

Como resultado del cultivo, la sustancia KA-7038  
se produce y acumula en el caldo de cultivo. Cuando la  
cantidad de la sustancia KA-7038 producida en el caldo  
de cultivo alcanza un máximo, se interrumpe el cultivo. La  
30 sustancia KA-7038 puede recogerse a partir del caldo de

1 cultivo.

5 Como la sustancia KA-7038 es una sustancia básica soluble en agua pero difícilmente soluble en los disolventes orgánicos comunes, la misma se puede separar del caldo de cultivo por utilización de los procedimientos que se emplean habitualmente en el aislamiento y purificación de los antibióticos básicos solubles en agua. Por ejemplo, se puede utilizar un método de adsorción-desorción con empleo de una resina de intercambio de ion, carbón activo, etc; un método de cromatografía en columna con utilización de celulosa, gel de sílice, alúmina, etc; y un método de extracción con butanol, alcohol amílico, etc, con empleo de un ácido graso superior como coadyuvante.

10

15 Por ejemplo, si el filtrado del caldo de cultivo se carga a una columna de una resina cambiadora de catión débilmente ácida, la sustancia KA-7038 se adsorbe a la misma. La sustancia KA-7038 se aísla después por elución con un álcali o ácido 0,1-3,0 N. El producto de elución activo resultante puede liofilizarse para proporcionar un polvo bruto de la sustancia KA-7038.

20

Ejemplos de la resina cambiadora de catión débilmente ácida utilizada para recuperar la sustancia KA-7038 son Amberlite IRC-50, IRC-84 y CG-50 (Rohm & Haas Co.); y Dialon WK-10 y WK-20 (Mitsubishi Chemical Co., Ltd.).

25 Ejemplos de álcalis que se pueden utilizar para la elución son solución de hidróxido de amonio, y una solución acuosa de hidróxido de sodio. Ejemplos de los ácidos son ácido fórmico, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico. Otro ejemplo del método de recuperación comprende ajustar el

30 pH del filtrado del caldo de cultivo a entre 7 y 9, poner

1 — en contacto el filtrado con carbón activo para hacer que  
la sustancia KA-7038 se adsorba al carbón activo, y eluir  
la sustancia con agua acidulada.

5 La sustancia KA-7038 que puede aislarse por los  
métodos descritos arriba se puede separar en KA-7038I, II,  
III, IV, V, VI y VII disolviendo la misma en agua, cargan-  
do la solución en una columna de un adsorbente tal como  
una resina cambiadora de ion débilmente ácida del tipo  
10 descrito arriba o un cambiador de ion débilmente ácido tal  
como CM-Sephadex ó CM-celulosa para hacer que la sustancia  
sea adsorbida por el adsorbente, y eluyéndola después con  
una solución acuosa alcalina tal como hidróxido de amonio  
diluido, o una solución acuosa de carbonato de amonio o  
formiato de amonio por un método de gradiente o un método  
15 por etapas. De acuerdo con este procedimiento de separa-  
ción, se separan sucesivamente la sustancia KA-7038 IV,  
la sustancia KA-7038 VII, la sustancia KA-7038 I, la sus-  
tancia KA-7038 II, la sustancia KA-7038 VI, la sustancia  
KA-7038 III y la sustancia KA-7038 V como bases libres.

20 Las sustancias resultantes KA-7038 I, II, III,  
IV, V, VI y VII separadas pueden encontrarse en forma de  
polvo por concentración del producto eluido y liofiliza-  
ción del condensado. Las mismas se pueden purificar por  
cromatografía en columna sobre, por ejemplo, celulosa,  
25 o resina cambiadora de anión fuertemente básica. Por ejem-  
plo, disolviendo el polvo en agua, haciendo que las mismas  
se adsorban en una columna de una resina cambiadora de  
anión fuertemente básica tal como Dowex 1x2 (Dow Chemical),  
eluyéndolas con agua desionizada, recogiendo las fraccio-  
30 nes activas y liofilizando las fracciones recogidas. Estas

1 — sustancias KA-7038 obtenidas como base libre se pueden con-  
vertir en sus sales de adición de ácido por tratamiento  
con ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente acep-  
tables. Ejemplos de tales ácidos son ácidos inorgánicos  
5 tales como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido yodhi-  
drico, ácido fosfórico, ácido carbónico, ácido nítrico,  
etc, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido  
fumárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido mandélico  
y ácido succínico.

10 La sustancia KA-7038 III tiene la fórmula estruc-  
tural de la sustancia KA-7038 I en la que se ha escindido  
el grupo  $-\text{COCH}_2\text{NH}_2$ . Por consiguiente, la sustancia KA-7038  
III puede obtenerse también por tratamiento de la sustan-  
cia KA-7038 I con álcalis o ácidos para descomponer la  
15 sustancia KA-7038 I y convertirla en la sustancia KA-7038  
III. Esta conversión puede efectuarse por tratamiento de  
la sustancia KA-7038 I con una solución acuosa 0,1-4N de  
un reactivo alcalino tal como hidróxido de sodio o hidróxi-  
do de bario o con una solución acuosa 0,1-1N de un reacti-  
vo ácido tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

20 En el caso de utilizar el reactivo alcalino, pue-  
de añadirse una resina cambiadora de anión fuertemente bá-  
sica [p. ej., Amberlite IRA 400 (forma  $\text{OH}^-$ ) o Dowex 1x2  
(forma  $\text{OH}^-$ )] y la reacción puede efectuarse en estado  
25 de suspensión. Análogamente, cuando se utiliza el reactivo  
ácido, se puede añadir una resina cambiadora de catión  
fuertemente ácida tal como Amberlite IR 120 (forma  $\text{H}^+$ ) o  
Dowex 50x8 (forma  $\text{H}^+$ ), y la reacción puede realizarse en  
estado de suspensión. La reacción se puede llevar a cabo  
30 usualmente a aproximadamente 30 a 100°C durante aproxima-

1 damente 0,5 a 3 horas.

Las propiedades físicas y químicas de las nuevas sustancias antibióticas KA-7038 I-VII se describen con mayor detalle a continuación.

5

Sustancia KA-7038 I (base libre)

(1) Naturaleza: polvo blanco

(2) Fórmula molecular:  $C_{17}H_{35}O_5N_5$

(3) Análisis elemental:

|               | C     | H    | N     |
|---------------|-------|------|-------|
| Calculado (%) | 52,42 | 9,06 | 17,98 |

10

|                |       |      |       |
|----------------|-------|------|-------|
| Encontrado (%) | 51,98 | 8,71 | 17,64 |
|----------------|-------|------|-------|

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

(5) Punto de fusión: 83 - 90°C

(6) Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} + 120,5^\circ$  (c 1, H<sub>2</sub>O)

(7) Espectro de absorción en ultravioleta:

15

A 220-360 nm, no se observa absorción característica alguna, y sólo existe una absorción terminal.

(8) Espectro de absorción en infrarrojo: El espectro de absorción en infrarrojo de una muestra en tableta de bromuro de potasio es como se representa en la Figura 1.

20

(9) Solubilidad: Muy fácilmente soluble en agua. Fácilmente soluble en metanol, poco soluble en etanol, ligeramente soluble en acetona. Insoluble en cloroformo, acetato de etilo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo.

25

(10) Reacción coloreada: Reacción con ninhidrina y reacción Rydon Smith - positivas; reacción de Sakaguchi, reacción con cloruro férrico y reacción de Fehling - negativas.

30

(11) Estabilidad: Estable a un pH de 2,0 a 8,0.

## (12) Espectro de resonancia magnética nuclear:

( $\delta_{D_2O}$ , ppm):2,75 (3H, s, 6'-N-CH<sub>3</sub>)3,12 (3H, s, 4-N-CH<sub>3</sub>)3,45 (3H, s, OCH<sub>3</sub>)4,06 (2H, s, COCH<sub>2</sub>N)

5,32 (1H, d, J=3,5 Hz, H anómero)

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

390 (M<sup>+</sup> + 1), 360, 276, 258, 230, 143

## (14) Cromatografía en papel:

Valor Rf: 0,86

Papel de filtro: Whatman Nº 1

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

(15) Cromatografía en capa delgada: Se utilizó hoja de aluminio para cromatografía en capa delgada (gel de sílice 60 R<sub>254</sub> 0,2 mm) (Merck & Co., Inc.).

| Valor Rf | Disolvente   |
|----------|--|
| 0,61     | Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido de amonio al 17% (4:5:2:5)             |
| 0,60     | Cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (1:8:3)                      |
| 0,16     | Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |
| 0,87     | Una capa superior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |

Sustancia KA-7038 II (base libre)

(1) Naturaleza: Polvo blanco

(2) Fórmula molecular: C<sub>13</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>

(3) Análisis elemental:

1

|                | C     | H    | N     |
|----------------|-------|------|-------|
| Calculado (%)  | 51,30 | 9,27 | 18,41 |
| Encontrado (%) | 51,12 | 8,87 | 18,10 |

(4) Peso molecular: 304 (espectro de masas)

5

(5) Punto de fusión: 8,5 - 102°C

(6) Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} + 61^\circ$  (c 1, H<sub>2</sub>O)

(7) Espectro de absorción en ultravioleta:

A 220-360 nm, no se observa ninguna absorción característica, sino que sólo existe una absorción terminal.

10

(8) Espectro de absorción infrarrojo: El espectro de absorción infrarrojo de una muestra en tableta de bromuro de potasio es como se indica en la Figura 2.

15

(9) Solubilidad: Muy fácilmente soluble en agua. Fácilmente soluble en metanol, poco soluble en etanol, ligeramente soluble en acetona. Insoluble en cloroformo, acetato de etilo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo.

20

(10) Reacción coloreada: Reacción de la ninhidrina y reacción Rydon Smith - positivas; reacción de Sakaguchi, reacción con cloruro férrico y reacción de Fehling - negativas.

(11) Estabilidad: Estable a un pH de 2,0 a 9,0.

(12) Espectro de resonancia magnética nuclear

25

( $\delta_{D_2O}$ , ppm):

2,83 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)

5,84 (1H, d, J=3,5Hz, H anómero)

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

305 (M<sup>+</sup> + 1), 214, 205, 177, 129

30

(14) Cromatografía en papel:

06089

1

Valor Rf: 0,18

Papel de filtro: Whatman Nº 1

Disolvente: Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1).

5

(15) Cromatografía en capa delgada:

Se utilizó hoja de aluminio para cromatografía en capa delgada (gel de sílice 60 R<sub>254</sub> 0,2 mm) (Merck & Co., Inc.).

10

| Valor Rf | Disolvente   |
|----------|--|
| 0,43     | Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido de amonio al 17% (4:5:2:5)             |
| 0,44     | Cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (1:8:3)                      |
| 0,06     | Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |
| 0,73     | Una capa superior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |

15

Sustancia KA-7038 III (base libre

(1) Naturaleza: Polvo blanco

20

(2) Fórmula molecular: C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>

(3) Análisis elemental:

|                | C     | H    | N     |
|----------------|-------|------|-------|
| Calculado (%)  | 54,19 | 9,70 | 16,85 |
| Encontrado (%) | 53,84 | 9,38 | 16,50 |

25

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

(5) Punto de fusión: 74 - 83°C

(6) Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} + 78^\circ$  (c 0,5, H<sub>2</sub>O)

(7) Espectro de absorción en ultravioleta: A 220-360 nm, no se observa ninguna absorción característica, sino que sólo existe una absorción terminal.

30

- 1 (8) Espectro de absorción en infrarrojo: El espectro de absorción en infrarrojo de una muestra en tableta de bromuro de potasio es como se muestra en la Figura 3.
- 5 (9) Solubilidad: Muy fácilmente soluble en agua. Fácilmente soluble en metanol, poco soluble en etanol, ligeramente soluble en acetona. Insoluble en cloroformo, acetato de etilo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo.
- 10 (10) Reacción coloreada: Reacción de la ninhidrina y reacción Rydon Smith - positivas; reacción de Sakaguchi, reacción con cloruro férrico y reacción de Fehling - negativas.
- (11) Estabilidad: Estable a un pH de 2,0 a 9,0.
- 15 (12) Espectro de resonancia magnética nuclear ( $\delta_{D_2O}$ , ppm): como sal de HCl.
- 2,73 (3H, s, 6' - N-CH<sub>3</sub>)
- 2,83 (3H, s, 4- N-CH<sub>3</sub>)
- 3,46 (3H, s, OCH<sub>3</sub>)
- 20 5,43 (1H, d, J=3,5Hz, H anómero)
- (13) Espectro de masas (m/e):
- 333 (M<sup>+</sup> + 1), 332, 283, 230, 219, 191, 143
- (14) Cromatografía en papel: Valor Rf: 0,92
- Papel de filtro: Whatman nº 1
- 25 Disolvente: una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1)
- (15) Cromatografía en capa delgada: Se utilizó hoja de aluminio para cromatografía en capa delgada (gel de sílice 60 F<sub>254</sub> 0,2 mm) (Merck & Co., Inc.).

| Valor Rf | Disolvente   |
|----------|--|
| 0,65     | Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido de amonio al 17% (4:5:2:5)             |
| 0,61     | Cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (1:8:3)                      |
| 0,35     | Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |
| 0,84     | Una capa superior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |

Sustancia KA-7038 IV (base libre)

(1) Naturaleza: Polvo blanco

(2) Fórmula molecular:  $C_{14}H_{30}O_5N_4$

(3) Análisis elemental:

|                | C     | H    | N     |
|----------------|-------|------|-------|
| Calculado (%)  | 50,28 | 9,04 | 16,75 |
| Encontrado (%) | 49,89 | 8,91 | 16,45 |

(4) Peso molecular: 334 (espectro de masas)

(5) Punto de fusión: 78 - 82°C

(6) Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} + 115^\circ$  (c 0,1, H<sub>2</sub>O)

(7) Espectro de absorción en ultravioleta:

A 220-360 nm, no se observa ninguna absorción característica, sino que sólo existe una absorción terminal.

(8) Espectro de absorción en infrarrojo: El espectro de absorción en infrarrojo de una muestra en tableta de bromuro de potasio es como se muestra en la Figura 4.

(9) Solubilidad: Muy rápidamente soluble en agua. Fácilmente soluble en metanol, poco soluble en etanol, ligeramente soluble en acetona. Insoluble en cloro-

- 1 formo, acetato de etilo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo.
- (10) Reacción coloreada: Reacción de la ninhidrina y reacción Rydon Smith - positivas; reacción de Sakaguchi, reacción con cloruro férrico y reacción de Fehling -  
5 negativas.
- (11) Estabilidad: Estable a un pH de 2,0 a 8,0.
- (12) Espectro de resonancia magnética nuclear ( $\delta_{D_2O}$ , ppm):  
(Como base libre)  
10 2,47 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
3,43 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>)  
5,08 (1H, d, H anómero)  
(Como sal de HCl)  
2,72 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
15 3,37 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>)  
5,44 (1H, d, H anómero)
- (13) Espectro de masas:  
335 ( $M^+ + 1$ ), 235, 207, 189, 129
- (14) Cromatografía en papel: Valor Rf: 0,63. Papel de filtro: Whatman Nº 1.  
Disolvente: Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1).
- (15) Cromatografía en capa delgada: Se utilizó hoja de aluminio para cromatografía en capa delgada (gel de sílice 60 F<sub>254</sub> 0,2 mm) (Merck & Co., Inc.).  
25

| Valor Rf | Disolvente   |
|----------|--|
| 0,56     | Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido de amonio al 17% (4:5:2:5)             |
| 0,62     | Cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (1:8:3)                      |
| 0,13     | Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |
| 0,85     | Una capa superior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |

Sustancia KA-7038 V (base libre)

(1) Naturaleza: Polvo blanco

(2) Fórmula molecular:  $C_{14}H_{30}O_4N_4$

(3) Análisis elemental: C H N

Calculado (%) 52,81 9,50 17,60

Encontrado (%) 52,70 9,33 17,41

(4) Peso molecular: 318 (espectro de masas)

(5) Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} + 98^\circ$  (c 0,5, H<sub>2</sub>O)

(6) Espectro de absorción en ultravioleta: A 220-360 nm, no se observa ninguna absorción característica, sino que sólo existe una absorción terminal.

(7) Espectro de absorción en infrarrojo: El espectro de absorción en infrarrojo de una muestra en tableta de bromuro de potasio es como se muestra en la Figura 5.

(8) Solubilidad: Muy fácilmente soluble en agua. Fácilmente soluble en metanol, poco soluble en etanol, ligeramente soluble en acetona. Insoluble en cloroformo, acetato de etilo, éter etílico, hexano y éter de petróleo.

- 1 (9) Reacción coloreada: Reacción de la ninhidrina y  
reacción Rydon Smith - positivas; reacción de  
Sakaguchi, reacción con cloruro férrico y reacción  
de Fehling - negativas.
- 5 (10) Estabilidad: Estable a un pH de 2,0 a 9,0.
- (11) Espectro de resonancia magnética nuclear ( $\delta_{D_2O}$ ,  
ppm) (Como base libre):
- 10 2,35 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
3,36 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>)  
5,12 (1H, d, H anómero)
- (Como sal de HCl)
- 2,78 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
3,43 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>)  
5,76 (1H, d, H anómero)
- 15 (12) Espectro de masas (m/e): 319 ( $M^+ + 1$ ), 219,  
191, 173, 129
- (13) Cromatografía en papel: Valor Rf: 0,82. Papel  
de filtro: Whatman Nº 1.  
Disolvente: Una capa inferior de cloroformo-  
-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1).
- 20 (14) Cromatografía en capa delgada: Se utilizó hoja  
de aluminio para cromatografía en capa delgada  
(gel de sílice 60 F<sub>254</sub> 0,2 mm) (Merck & Co.,  
Inc.).

06089

| Valor Rf | Disolvente   |
|----------|--|
| 0,57     | Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido de amonio al 17% (4:5:2:5)             |
| 0,55     | Cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (1:8:3)                      |
| 0,25     | Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |
| 0,81     | Una capa superior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |

Sustancia KA-7038 VI (base libre)

(1) Naturaleza: Polvo blanco

(2) Fórmula molecular:  $C_{15}H_{32}O_4N_4$

| (3) Análisis elemental: | C     | H    | N     |
|-------------------------|-------|------|-------|
| Calculado (%)           | 54,19 | 9,70 | 16,85 |
| Encontrado (%)          | 53,83 | 9,87 | 16,59 |

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

(5) Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} + 58^\circ$  (c 1, H<sub>2</sub>O)

(6) Espectro de absorción en ultravioleta: A 220 - 360 nm, no se observa ninguna absorción característica, sino que sólo existe una absorción terminal.

(7) Espectro de absorción en infrarrojo: El espectro de absorción en infrarrojo de una muestra en tableta de bromuro de potasio es como se muestra en la Figura 6.

(8) Solubilidad: Muy fácilmente soluble en agua. Fácilmente soluble en metanol, poco soluble en etanol, ligeramente soluble en acetona. Insoluble en cloroformo, acetato de etilo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo.

- 1 (9) Reacción coloreada: Reacción de la ninhidrina y reacción de Rydon Smith - positivas; reacción de Sakaguchi, reacción con cloruro férrico y reacción de Fehling - negativas.
- 5 (10) Estabilidad: Estable a un pH de 2,0 a 8,0.
- (11) Espectro de resonancia magnética nuclear ( $\delta_{D_2O}$ , ppm):
- 2,87 (3H, s, 6'-N-CH<sub>3</sub>)
- 2,93 (3H, s, 4-N-CH<sub>3</sub>)
- 3,87 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>)
- 10 5,57 (1H, d, H anómero)
- (12) Espectro de masas (m/e):
- 333 (M<sup>+</sup> + 1), 332, 283, 230, 219, 191, 143
- (13) Cromatografía en papel: Valor Rf: 0,91. Papel de filtro: Whatman Nº 1.
- 15 Disolvente: Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1).
- (14) Cromatografía en capa delgada: Se utilizó hoja de aluminio para cromatografía en capa delgada (gel de sílice 60 F<sub>254</sub> 0,2 mm) (Merck & Co., Inc.).

20

| Valor Rf | Disolvente   |
|----------|--|
| 0,63     | Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido de amonio al 17% (4:5:2:5)             |
| 0,60     | Cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (1:8:3)                      |
| 25 0,29  | Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |
| 0,62     | Una capa superior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |

Sustancia KA-7038 VII (base libre)

30

- (1) Naturaleza: Polvo blanco

06089

- 1 (2) Fórmula molecular:  $C_{14}H_{30}O_4N_4$
- (3) Análisis elemental:
- |                | C     | H    | N     |
|----------------|-------|------|-------|
| Calculado (%)  | 52,81 | 9,50 | 17,60 |
| Encontrado (%) | 52,50 | 9,78 | 17,41 |
- 5 (4) Peso molecular: 318 (espectro de masas)
- (5) Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} + 59^\circ$  (c 1,  $H_2O$ )
- (6) Espectro de absorción en ultravioleta: A 220 - 360 nm, no se observa ninguna absorción característica, sino que sólo existe una absorción terminal.
- 10 (7) Espectro de absorción en infrarrojo: El espectro de absorción en infrarrojo de una muestra en tableta de bromuro de potasio es como se muestra en la Figura 7.
- 15 (8) Solubilidad: Muy fácilmente soluble en agua. Fácilmente soluble en metanol, poco soluble en etanol, ligeramente soluble en acetona. Insoluble en cloroformo, acetato de etilo, éter dietílico, hexano y éter de petróleo.
- 20 (9) Reacción coloreada: Reacción de la ninhidrina y reacción Rydon Smith - positivas; reacción de Sakaguchi, reacción con cloruro férrico y reacción de Fehling - negativas.
- (10) Estabilidad: Estable a un pH de 2,0 a 9,0.
- 25 (11) Espectro de resonancia magnética nuclear ( $\delta_{D_2O}$ , ppm):
- 2,92 (3H, s, N- $\underline{CH}_3$ )
- 3,93 (3H, s, O- $\underline{CH}_3$ )
- 5,63 (1H, d, H anómero)
- 30 (12) Espectro de masas: (m/e):

1

319 ( $M^+$  + 1), 219, 191, 173, 129

(13) Cromatografía en papel: Valor Rf: 0,65. Papel de filtro: Whatman Nº 1.

5

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

(14) Cromatografía en capa delgada: Se utilizó hoja de aluminio para cromatografía en capa delgada (gel de sílice 60 F<sub>254</sub> 0,2 mm) (Merck & Co., Inc.).

10

| Valor Rf | Disolvente   |
|----------|--|
| 0,62     | Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido de amonio al 17% (4:5:2:5)             |
| 0,61     | Cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (1:8:3)                      |
| 0,28     | Una capa inferior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |
| 0,63     | Una capa superior de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (2:1:1) |

15

20

Los valores Rf por cromatografía en papel de la nueva sustancia antibiótica KA-7038 I-VII se muestran en la Tabla I a continuación, comparados con los de antibióticos conocidos. Datos similares obtenidos por cromatografía en capa delgada se muestran en la Tabla 2 siguiente.

25

Se ha encontrado que la sustancia KA-7038 difiere grandemente en propiedades físicoquímicas de las kanamicinas A, B y C, la tobramicina, la paromomicina, las neomicinas A, B y C, las butirosinas A y B, las lividomicinas A y B, la ribostamicina, la xilistatina, la apramicina, las gentamicinas A y B, y la sorbistina, así como de la sustancia antibiótica Nº 460, que son sustancias antibióticas básicas solubles en agua y dextrorrotatorias

30

06089

1 conocidas. Además, la sustancia KA-7038 difiere de los  
antibióticos conocidos que se muestran en las Tablas 1 y  
2 en los valores Rf determinados por cromatografía en pa-  
pel y cromatografía en capa delgada.

5 TABLA 1

Valores Rf de las sustancias KA-7038 y de antibióticos  
conocidos. Sistema disolvente: una capa inferior  
de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17%  
(2:1:1). Papel de filtro: Whatman N° 1.

10

| Antibióticos                  | Valor Rf |
|-------------------------------|----------|
| KA-7038I                      | 0,86     |
| KA-7038II                     | 0,18     |
| KA-7038III                    | 0,92     |
| 15 KA-7038IV                  | 0,63     |
| KA-7038V                      | 0,82     |
| KA-7038VI                     | 0,91     |
| KA-7038VII                    | 0,65     |
| KA-6606I                      | 0,53     |
| 20 KA-6606II                  | 0,86     |
| KA-6606III                    | 0,27     |
| KA-6606IV                     | 0,55     |
| KA-6606V                      | 0,91     |
| KA-6606VI                     | 0,94     |
| 25 Gentamicina C <sub>1</sub> | 0,59     |
| Gentamicina C <sub>2</sub>    | 0,35     |
| Gentamicina C <sub>1a</sub>   | 0,12     |
| Sagamicina                    | 0,49     |
| Sisomicina                    | 0,12     |
| 30 Verdamicina                | 0,35     |

1

Tabla 1 (Cont.)

| Antibióticos        | Valor Rf   |
|---------------------|------------|
| G-52                | 0,49       |
| Fortimicina A       | 0,32       |
| Fortimicina B       | 0,89       |
| Otros ( $\times$ 1) | 0,0 - 0,05 |

5

(<sup>#</sup>): "Otros" representan las kanamicinas A, B y C, paromomicina, neomicinas A, B y C, butirosinas A y B, lividomicinas A y B, ribostamicina, xilostatina, gentamicinas A y B, tobramicina, apramicina, sorbistina, sustancia antibiótica 460, higromicina, o destomicina.

10

15

Tabla 2

Valores Rf de las sustancias KA-7038 y antibióticos conocidos.

Sistema disolvente

Disolvente a: Butanol-etanol-cloroformo-hidróxido de amonio al 17% (4:5:2:5)

20

Disolvente b: Cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 17% (1:8:3)

25

Placa: Hoja de aluminio para cromatografía en capa delgada (gel de sílice 60 F<sub>254</sub> 0,2 mm) (Merck & Co., Inc.).

| Antibióticos                | Valor Rf        |                 |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|
|                             | Disolvente<br>a | Disolvente<br>b |
| KA-7038I                    | 0,61            | 0,60            |
| KA-7038II                   | 0,43            | 0,44            |
| KA-7038III                  | 0,65            | 0,61            |
| KA-7038IV                   | 0,56            | 0,62            |
| KA-7038V                    | 0,57            | 0,55            |
| KA-7038VI                   | 0,63            | 0,60            |
| KA-7038VII                  | 0,62            | 0,61            |
| KA-6606I                    | 0,56            | 0,60            |
| KA-6606II                   | 0,57            | 0,52            |
| KA-6606III                  | 0,55            | 0,64            |
| KA-6606IV                   | 0,56            | 0,66            |
| KA-6606V                    | 0,64            | 0,61            |
| KA-6606VI                   | 0,69            | 0,73            |
| Gentamicina C <sub>1</sub>  | 0,52            | 0,40            |
| Gentamicina C <sub>2</sub>  | 0,51            | 0,44            |
| Gentamicina C <sub>1a</sub> | 0,43            | 0,34            |
| Sagamicina                  | 0,45            | 0,32            |
| Fortimicina A               | 0,53            | 0,56            |
| Fortimicina B               | 0,60            | 0,70            |

Los espectros antimicrobianos de las nuevas sustancias antibióticas KA-7038 I-VII se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

|   | I    | II   | III  | IV   | V    | VI   | VII  |
|---|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P   | 1,5  | 50   | 25   | 25   | 50   | 25   | 50   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> Smith  | 0,4  | 25   | 6    | 12   | 25   | 6    | 25   |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633  | 0,2  | 6    | 12   | 3    | 3    | 12   | 6    |
| <i>Bacillus cereus</i>  | 3    | 100  | 100  | 50   | 50   | 100  | 50   |
| <i>Bacillus anthracis</i>   | 0,4  | 3    | 6    | 1,5  | 1,5  | 6    | 3    |
| <i>Streptococcus faecalis</i>   | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Escherichia coli</i> NIHJ  | 6    | 100  | 100  | 50   | 50   | 100  | 100  |
| <i>Escherichia coli</i> ML1410  | 12   | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Escherichia coli</i> ML1410R-81<br>(resistente a kanamicina,<br>estreptomycinina y lividomycinina) | 50   | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Escherichia coli</i> ML1410R-82<br>(resistente a kanamicina,<br>estreptomycinina y butirosina)     | 25   | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Escherichia coli</i> ML1410R-101<br>(resistente a gentamicina,<br>na, tobramicina y kanamicina)    | 12   | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |

Tabla 3 (Continuación)

|   | I  | II   | III  | IV   | V    | VI   | VII  |
|---|----|------|------|------|------|------|------|
| <i>Proteus vulgaris</i> OX19            | 6  | 100  | 100  | 50   | 50   | 100  | 100  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI 602    | 6  | 100  | >100 | 100  | >100 | 100  | 100  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Shibata   | 6  | 100  | >100 | 100  | >100 | 100  | >100 |
| <i>Proteus inconstans</i>               | 12 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Serratia</i> sp.                     | 6  | >100 | 50   | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607 | 3  | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |

Las toxicidades agudas de las sustancias KA-7038 I-VII de esta invención determinadas empleando ratones son como sigue:



1 De acuerdo con esta invención, puede proporci-  
narse también una composición antibiótica compuesta de (i)  
una cantidad efectiva como antibiótico de una sustancia  
antibiótica KA-7038 seleccionada del grupo constituido por  
5 compuestos que tienen la fórmula I-VII indicada arriba, mez-  
clas de los mismos y sales de adición de ácido farmacéuti-  
camente aceptables de los mismos y (ii) un diluyente o ve-  
hículo farmacéuticamente aceptable.

10 La cantidad del compuesto (i) es, por ejemplo,  
aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99,5% en peso, ba-  
sada en el peso de la composición.

15 La composición antibiótica de esta invención pue-  
de encontrarse en cualquiera de las formas de dosificación  
empleadas usualmente, pero se prefieren especialmente pre-  
paraciones inyectables y cápsulas.

20 Preferiblemente, como en el caso de los antibió-  
ticos básicos solubles en agua conocidos, un inyectable se  
prepara por introducción de un polvo liofilizado del anti-  
biótico en un vial, preferiblemente junto con un estabili-  
zador, y en el momento de su empleo, el contenido del vial  
se disuelve en un líquido disolvente para su administración.

25 El diluyente o vehículo incluye, por ejemplo, di-  
luyentes líquidos tales como agua destilada para inyección  
y solución isotónica fisiológica, y vehículos sólidos tales  
como lactosa, almidón, azúcar refinada, glucosa, celulosa  
cristalina, carbonato de calcio, caolín, D-manita, metasili-  
cato-aluminato de magnesio, sulfato de calcio, fosfato de  
calcio, y bentonita. Se prefiere también la adición de es-  
tabilizadores tales como bisulfito de sodio ácido.

30 La dosificación de la sustancia antibiótica de

1 - esta invención puede seleccionarse adecuadamente, y es, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg/día.

5 Así, de acuerdo con esta invención, pueden proporcionarse composiciones antibióticas para animales distintos de los seres humanos, tales como aves de corral, animales domésticos y peces de criadero, y composiciones antibióticas para seres humanos. Estas composiciones son útiles como agentes antibacterianos que tienen un espectro antibacteriano amplio.

10 La sustancia KA-7038 de esta invención es también útil como material para la producción de sus derivados.

Los Ejemplos siguientes ilustran la presente invención con mayor detalle.

15 Ejemplo 1

Se inoculó una cepa de Streptomyces KC-7038 en un medio de cultivo esterilizado compuesto de 4% de almidón, 0,5% de harina de soja, 4% de licor de maceración de maíz, 0,05% de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,3% de cloruro de sodio y 0,1% de carbonato de calcio. (El pH se ajustó a 7,0 antes de la esterilización). La cepa se precultivó durante aproximadamente 48 horas a 27°C para formar una cepa de primera siembra.

25 Se cargó un depósito de 200 litros con 100 litros de un medio de cultivo obtenido por adición de 1% de aceite de semilla de algodón al mismo medio de cultivo que el utilizado para formar el cultivo de siembra. Después de ello, se inocularon 500 ml de la primera siembra, y se cultivaron durante 4 días a 27°C bajo aireación y agitación

30 (220 revoluciones por minuto; caudal de aire: 50 litros/mi-

1 -nuto).

5 Después de la fermentación, se añadió ácido sulfúrico diluido al caldo de fermentación para ajustar su pH a 2,0; y se añadió Dicalite (Dicalite Orient Co., Ltd.) como coadyuvante de filtración, y se separaron los micelios por filtración. Se añadió una solución acuosa diluida de hidróxido de sodio al filtrado para ajustar su pH a 6,2, y se pasó el filtrado a través de una columna de Amberlite IRC-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ), una resina cambiadora de catión débilmente ácida. Después de lavar con agua, el material adsorbido se eluyó con solución de amoníaco 1N. Se recogieron las fracciones activas, se concentraron a presión reducida, y se liofilizaron para proporcionar 9,7 g de un polvo bruto de sustancia KA-7038.

15 Se disolvieron 9,7 g del polvo bruto en 1 litro de agua destilada, y la solución se ajustó a pH 7,0 con ácido sulfúrico diluido. Se pasó luego la solución a través de una columna (3 x 150 cm) de una resina cambiadora de ion, CM-Sephadex C-25 (forma  $\text{NH}_4^+$ ), seguido por lavado con agua. El material adsorbido se eluyó a un ritmo de 60 ml por hora utilizando un método de gradiente de concentración entre 5 litros de solución de amoníaco 0,05 N y 5 litros de solución de amoníaco 0,5 N. Los productos de elución se fraccionaron en fracciones cada una de las cuales tenía un volumen de 30 ml. La actividad de cada fracción se midió por un método de disco de papel utilizando una placa de agar de *Bacillus subtilis*.

25 Las fracciones activas Nos. 96 a 112 se liofilizaron para proporcionar 0,65 g de un polvo bruto que contenía la sustancia KA-7038. La liofilización de las fraccio-

30

1 nes Nos. 135 a 149 proporcionó 0,36 g de un polvo bruto  
de una mezcla de sustancia KA-7038 I, sustancia KA-7038 II  
y sustancia KA-7038 VI. Adicionalmente, se obtuvieron 0,9  
5 g de una base libre de sustancia KA-7038 III a partir de  
las fracciones Nos. 150 a 172.

Después de ello, se obtuvieron 0,12 g de un polvo  
bruto de sustancia KA-7038 V a partir de las fracciones ac-  
tivas Nos. 173 a 212.

10 Una muestra de la sustancia KA-7038 (0,65 g) se  
cargó como una capa uniforme en una columna rellena con  
300 ml de polvo de celulosa. Se reveló con una capa infe-  
rior de una mezcla de cloroformo-metanol-solución de am-  
niaco al 17% (2:1:1) como eluyente a un ritmo de 30 ml por  
hora. El producto de elución se dividió en fracciones, ca-  
15 da una de las cuales tenía un volumen de 10 ml, y la acti-  
vidad de cada fracción se midió de un modo similar al des-  
crito arriba. Las fracciones activas se recogieron, se con-  
centraron a sequedad, y se cargaron como una capa uniforme  
en una columna rellena con 160 ml de gel de sílice. Utili-  
20 zando la capa inferior de una solución de cloroformo-meta-  
nol-amoniaco al 17% (2:1:1) como eluyente, se eluyó a un  
ritmo de 30 ml por hora. El producto de elución se dividió  
en fracciones, cada una de las cuales tenía un volumen de  
3 ml, y la actividad de cada fracción se midió de un modo  
25 similar al descrito arriba. Las fracciones que contenían  
la sustancia KA-7038 IV que se eluyeron subsiguientemente  
a la elución de uno o dos componentes de menor importancia  
se recogieron, y el disolvente se separó por destilación  
a presión reducida. El residuo se disolvió en 20 ml de agua,  
30 y se pasó a través de una columna rellena con 5 ml de una

1 -resina cambiadora de catión débilmente ácida, CM-Sephadex  
C-25 ( $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavado con agua, el material adsor-  
bido se eluyó con solución de amoníaco 0,5N, y se recogie-  
ron las fracciones activas. La liofilización de las fraccio-  
5 nes activas dió 0,01 g de una base libre de sustancia KA-  
7038 IV como un polvo amorfo incoloro.

Un polvo bruto (0,4 g) de una mezcla de sustan-  
cia KA-7038 I y sustancia KA-7038 VII se cargó como una ca-  
pa uniforme en una columna rellena con 200 ml de celulosa,  
10 y se cromatografió utilizando la capa inferior de una mez-  
cla de cloroformo-metanol-solución de amoníaco al 17%  
(2:1:1) como eluyente, después de lo cual se eluyeron la  
sustancia KA-7038 I y después la sustancia KA-7038 VII. La  
fracción que contenía la sustancia KA-7038 VII se concen-  
15 tró a sequedad, y se disolvió de nuevo en agua. Se adsor-  
bió la solución en una columna de 15 ml de una resina cam-  
biadora de catión débilmente ácida, CM-Sephadex C-25 (for-  
ma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavar con agua, el material adsorbido  
se eluyó por un método de gradiente de concentración entre  
20 300 ml de solución de amoníaco 0,04 N y 300 ml de solución  
de amoníaco 0,4 N. Las fracciones que contenían la sustan-  
cia KA-7038 VII se recogieron, y se liofilizaron para pro-  
porcionar 0,01 g de una base libre de un polvo incoloro.

Por otra parte, cuando se concentraron a seque-  
25 dad fracciones que contenían la sustancia KA-7038 I, se  
obtuvieron 0,31 g de un polvo bruto de sustancia KA-7038 I.  
El polvo bruto se disolvió en agua destilada, y se adsorbió  
en una columna rellena con 1000 ml de una resina cambiadora  
de catión débilmente ácida, CM-Sephadex C-25 (forma  $\text{NH}_4^+$ ),  
30 seguido por lavado con agua. El material adsorbido se elu-

1 yó por un método de gradiente de concentración entre 2,25  
litros de agua y 2,25 litros de solución de amoníaco 0,5 N.  
Se midió la actividad de cada fracción. Se recogieron las  
fracciones activas, y se liofilizaron para proporcionar 0,21  
5 g de una base libre de sustancia KA-7038 I en forma de un  
polvo amorfo incoloro.

Una mezcla (0,26 g) de sustancia KA-7038 I, sus-  
tancia KA-7038 II y sustancia KA-7038 VI se cargó como una  
capa uniforme en una columna rellena con 300 ml de polvo  
10 de celulosa. Se eluyó utilizando la capa inferior de una  
mezcla de cloroformo-metanol-solución de amoníaco al 17%  
(2:1:1) a un ritmo de 30 ml por hora. El producto eluido  
se dividió en fracciones, cada una de las cuales tenía un  
volumen de 10 ml. Se midió la actividad de cada fracción  
15 por el mismo método indicado arriba. Como resultado, se elu-  
yó primeramente la sustancia KA-7038 VI, y luego se eluye-  
ron sucesivamente la sustancia KA-7038 I y la sustancia  
KA-7038 II.

Se recogieron las fracciones activas de sustancia  
20 KA-7038 II, y se separó el disolvente por destilación a pre-  
sión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en 20 ml de  
agua, y se hizo pasar a través de una columna rellena con  
5 ml de una resina cambiadora de catión débilmente ácida,  
CM-Sephadex C-25 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de lavar con agua,  
25 el material adsorbido se eluyó con solución de amoníaco  
0,5 N. Se recogieron las fracciones activas, y se liofili-  
zaron para proporcionar 0,05 g de una base libre de sustan-  
cia KA-7038 II en forma de un polvo amorfo incoloro.

Se recogieron las fracciones que contenían la  
30 sustancia KA-7038 VI, y el disolvente se separó por desti-

1 lación a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo  
en 100 ml de agua, y se hizo pasar a través de una columna  
rellena con 40 ml de una resina cambiadora de catión débil-  
mente ácida, CM-Sephadex C-25 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Después de la-  
5 var con agua, el material adsorbido se eluyó por un método  
de gradiente de concentración entre 500 ml de solución de  
amoníaco 0,1 N y 500 ml de solución de amoníaco 0,5 N. Se  
recogieron las fracciones que contenían la sustancia KA-  
7038 VI, y se liofilizaron para proporcionar 0,07 g de una  
10 base libre de la sustancia KA-7038 VI.

El polvo bruto (0,12 g) de la sustancia KA-7038 V  
se disolvió en agua destilada, y se adsorbió en una colum-  
na rellena con 1000 ml de una resina cambiadora de catión  
débilmente ácida, CM-Sephadex C-25 (forma  $\text{NH}_4^+$ ). Después  
15 de lavar con agua, el material adsorbido se eluyó por un  
método de gradiente de concentración entre 2,25 litros de  
agua y 2,25 litros de solución de amoníaco 0,5 N.

Se midió la actividad de cada una de las fraccio-  
nes resultantes de la misma manera que anteriormente. Se re-  
20 cogieron las fracciones activas, y se liofilizaron para  
proporcionar 0,02 g de una base libre de la sustancia  
KA-7038 V en forma de un polvo amorfo incoloro.

#### Ejemplo 2

El polvo liofilizado de sustancia KA-7038 I ob-  
25 tenido en el Ejemplo 1 (unidades de 100 g) se disolvió en  
500 ml de agua, y se añadió ácido sulfúrico diluido para  
ajustar el pH a 5,0-7,0. La liofilización de la solución  
proporcionó 160 g de un polvo de sulfato de la sustancia  
KA-7038 I,

#### Ejemplo 3

1                    Se mezclaron uniformemente el polvo liofilizado  
de sulfato de la sustancia KA-7038 I (unidades de 20 g)  
y 200 mg de sulfito de sodio ácido, y la mezcla se vertió  
5                    en 100 viales. Cada uno de los viales contenía 200 mg (uni-  
dades) de sulfato de la sustancia KA-7038 I. Antes de su  
empleo, la solución contenida en un vial se disolvió en 2  
a 5 ml de agua destilada para inyecciones. La solución pue-  
de administrarse por vías intramuscular o intravenosa, o  
bien puede infundirse por vía intravenosa en forma de una  
mezcla con una infusión nutriente.  
10

06089

1

REIVINDICACIONES

5

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

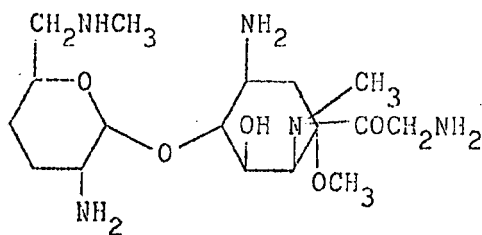
10

1ª.- Un procedimiento para la preparación de la sustancia antibiótica KA-7038, que comprende cultivar una cepa productora de la sustancia antibiótica KA-7038 perteneciente al género Streptomyces y aislar la sustancia antibiótica KA-7038 a partir del caldo de cultivo.

15

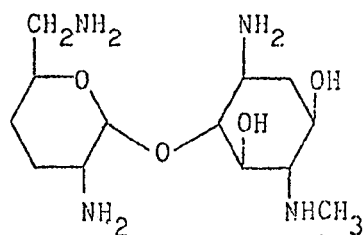
2ª.- El procedimiento de la reivindicación 1ª, que comprende adicionalmente separar a partir de la sustancia antibiótica KA-7038 resultante al menos un antibiótico seleccionado del grupo constituido por compuestos que tienen la fórmula siguiente I a VII:

20



fórmula I

25

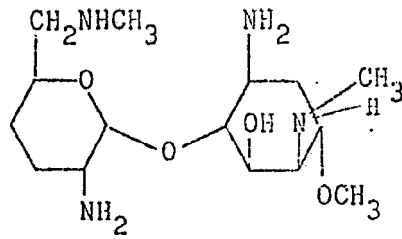


fórmula II

30

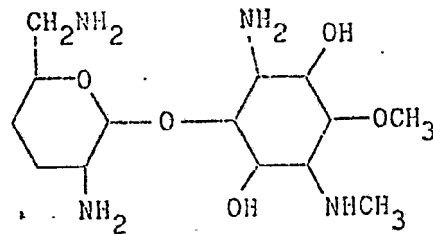
05099

1



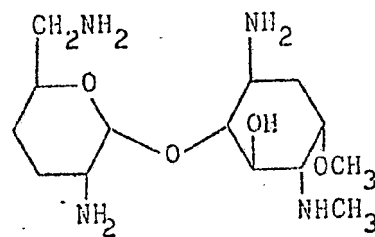
fórmula III

5



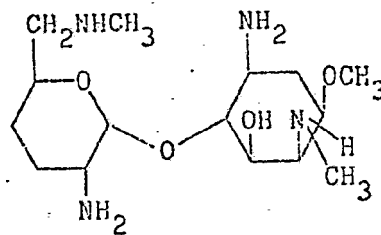
fórmula IV

10



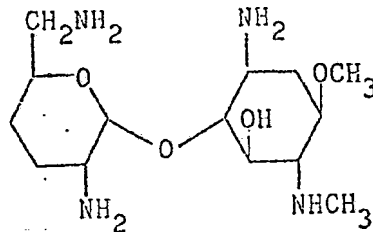
fórmula V

15



fórmula VI

20



fórmula VII

25

3<sup>a</sup>.— El procedimiento de la reivindicación 2<sup>a</sup>, que comprende adicionalmente tratar el antibiótico resultante con un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptable para obtener un antibiótico en la forma de una sal de adición de ácido.

30

4<sup>a</sup>.— El procedimiento de la reivindicación 1<sup>a</sup>, en

05099

1 el que la cepa productora de la sustancia antibiótica KA-  
-7038 es Streptomyces sp. KC-7038.

5 5ª.- El procedimiento de la reivindicación 1ª, en  
el que el cultivo se realiza en condiciones aerobias a una  
temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 35°C.

6ª.- "Un procedimiento para la preparación de la  
sustancia antibiótica KA-7038".

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-  
cede, representado en los dibujos que se acompañan y con  
los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de CUARENTA Y CUATRO hojas es-  
critas a máquina por una sola cara.

Madrid, 03.OCT.1979

P.A.

15

**Alberto de Elizaburu**  
Por Poder. 

20

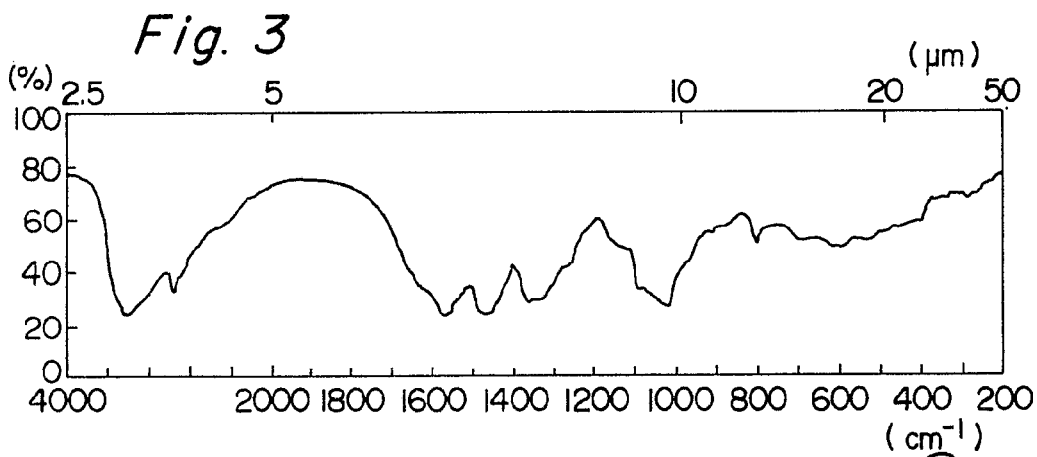
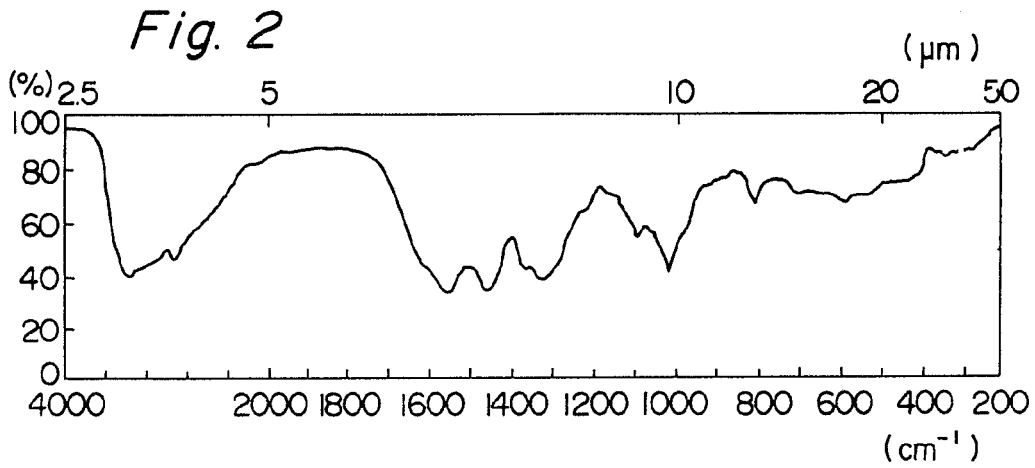
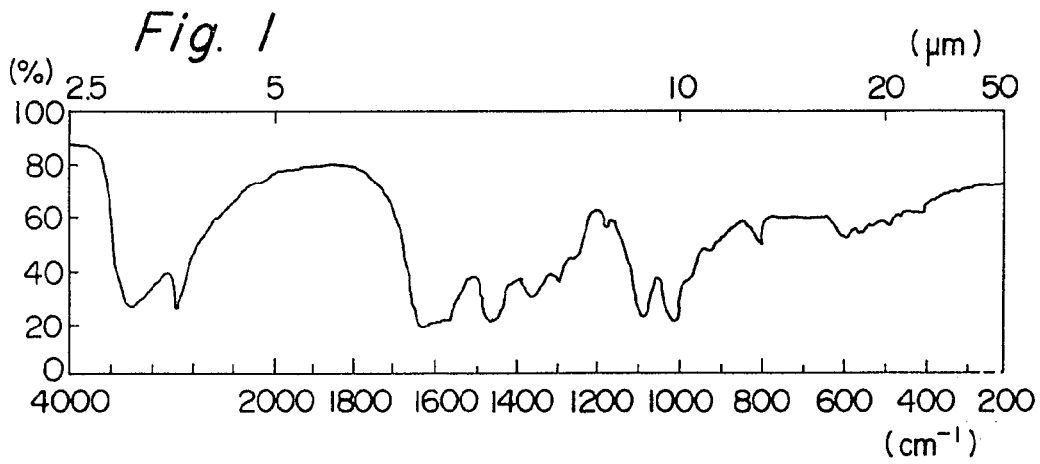
25

30

05099

VAL

1724



Alberto de Elizaburu  
Por Poder

Fig. 4

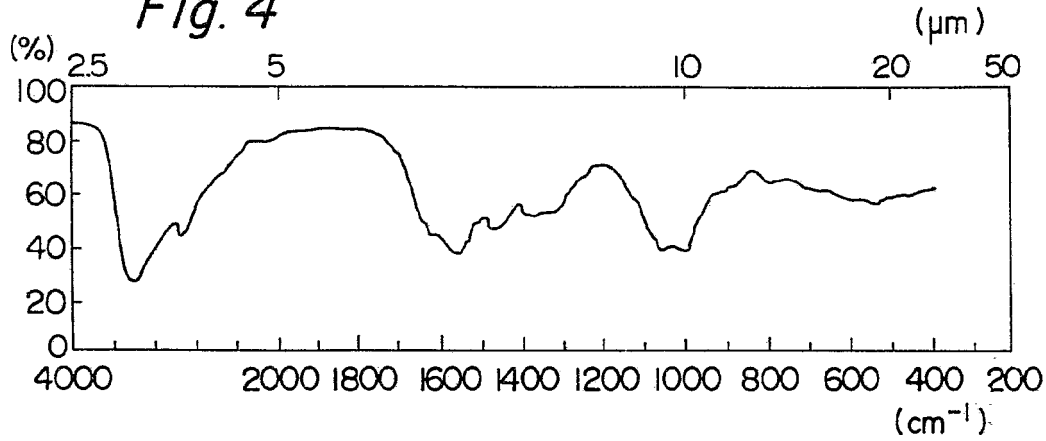


Fig. 5

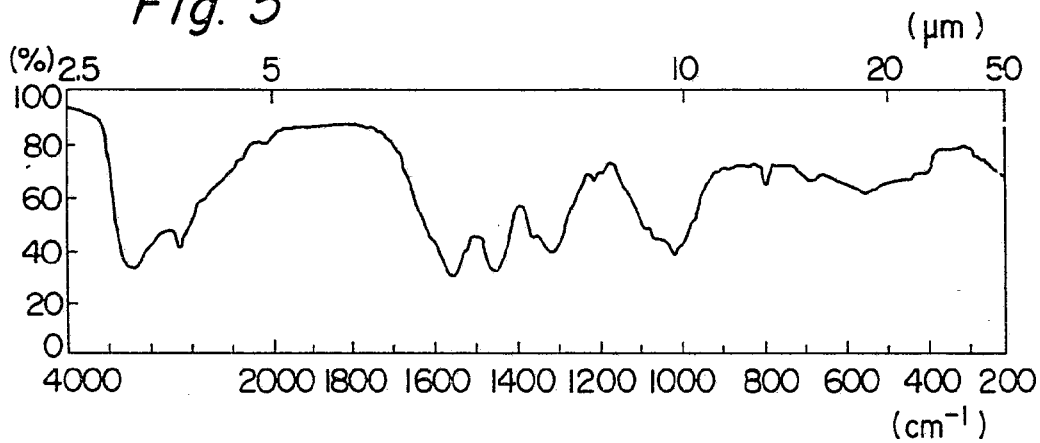
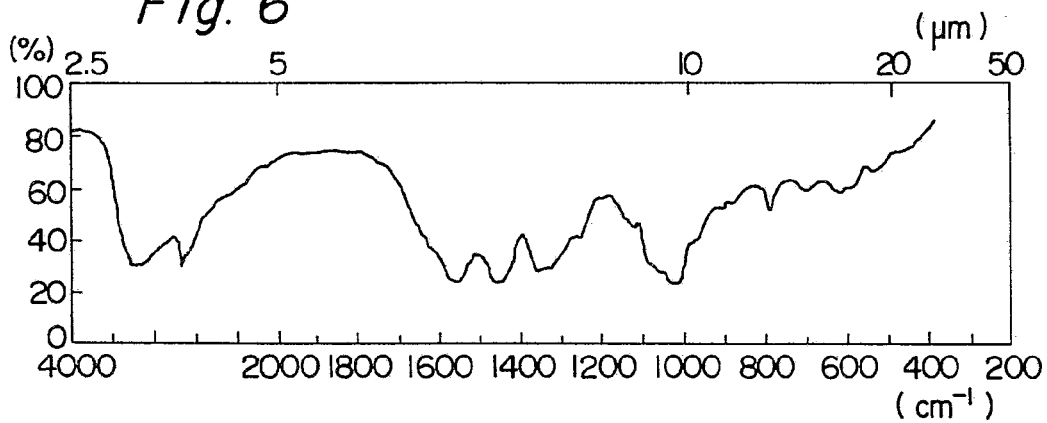
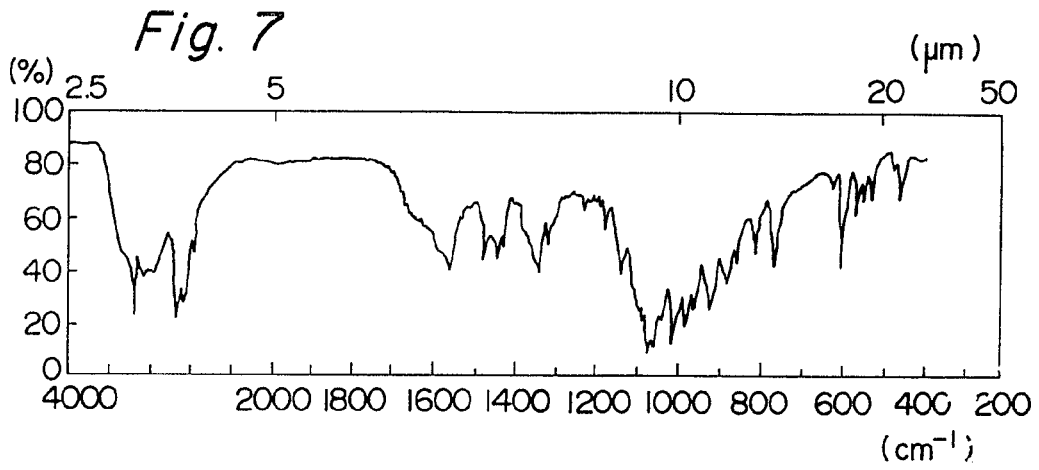


Fig. 6





Alberto de Arce  
For Poder,